

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN BAZI ZEYTİN (*OLEA
EUROPAEA L.*) KÜLTİVARLARINDA POLİMORFİZMİN
ARAŞTIRILMASI VE FİLOGENETİK ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KADRİYE GÜVEN

BALIKESİR, AĞUSTOS - 2013

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN BAZI ZEYTİN (*OLEA
EUROPAEA L.*) KÜLTİVARLARINDA POLİMORFİZMİN
ARAŞTIRILMASI VE FİLOGENETİK ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KADRİYE GÜVEN

BALIKESİR, AĞUSTOS - 2013

KABUL VE ONAY SAYFASI

Kadriye GÜVEN tarafından hazırlanan "TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN BAZI ZEYTİN (*OLEA EUROPAEA* L.) KÜLTİVARLARINDA POLİMORFİZMİN ARAŞTIRILMASI VE FİLOGENETİK ANALİZİ" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 27.08.2013 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Fatih COŞKUN

Üye
Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR

Üye
Doç. Dr. Sevcan ÇELENK



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Hilmi NAMLI

.....

Bu tez çalışması Uludağ Üniversitesi tarafından 2011-76 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN BAZI ZEYTİN (*OLEA EUROPAEA L.*)
KÜLTİVARLARINDA POLİMORFİZMİN ARAŞTIRILMASI VE
FİLOGENETİK ANALİZİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KADRIYE GÜVEN
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI:YRD. DOÇ. DR. FATİH COŞKUN)

BALIKESİR, AĞUSTOS - 2013

Bu çalışmanın amacı, Türkiye'de yetişen ve çoğunlukla yağ ve sofralık zeytin üretiminde kullanılan bazı zeytin çeşitleri (*Olea europaea L.* cv. Gemlik ve *Olea europaea L.* cv. Çelebi) arasındaki filogenetik ilişkileri anlamak, genomik DNA bölgelerindeki nükleotit varyasyonlarını değerlendirmek ve birkaç potansiyel polimorfik bölge analiz edilerek zeytin kültürleri arasındaki çeşitliliği belirlemektir.

İki zeytin çeşidine (Gemlik ve Çelebi) ait 16 örneğin total genomik DNA'sı fenol-kloroform-izoamilalkol protokolüne göre izole edildi. 16 örneğin nrDNA ITS bölgeleri ile soğuk stresini indükleyen protein / dehidrin genine benzediği varsayılan ve DK31 olarak adlandırılan bölgesi çoğaltıldı ve dizilendi. Bu dizilerin filogenetik analizi yapıldı.

ITS bölgeleri kullanılarak elde edilen ağaçların dallanma modeli tam olarak belirlenemedi. Buna rağmen kullanılan yeni markır (DK31) zeytin çeşitlerini ayırmak için yeterli miktarda polimorfizm oluşturdu ve politomi problemi çözüme kavuşturuldu.

ANAHTAR KELİMELER: *Olea europaea L.*, ITS, DK31, filogenetik analiz

ABSTRACT

POLYMORPHISMS RESEARCH AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF
SOME OLIVE CULTIVARS (*OLEA EUROPAEA* L.) GROWN IN
TURKEY
MSC THESIS
KADRIYE GÜVEN
BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BİOLOGY

(SUPERVISOR: ASSIST. PROF. DR. FATİH COŞKUN)

BALIKESİR, AUGUST 2013

The purposes of this study, are to understand of phylogenetic relationships, to evaluate of variations in genomic DNA regions and to determine varieties between olive cultivars by analyzing some potential polymorphic region from some olive oil and table olive cultivars (*Olea europaea* L. cv. Gemlik and *Olea europaea* L. cv. Çelebi) growing in Turkey

Total genomic DNAs of 16 olive samples belonging to two olive cultivars (i.e., Çelebi and Gemlik) were isolated using phenol-chloroform-isoamyl alcohol procedure. ITS nrDNA region and stress-inducing protein/dehydrine alike putative gene, DK31, were amplified and sequenced. Phylogenetic analysis of these sequences were performed.

Branching patterns of ITS nrDNA trees were not determined exactly. However, the new molecular marker, DK31, displayed sufficient polymorphism to distinguish the olive cultivars and the polytomy problem was resolved.

KEYWORDS: *Olea europea* L., ITS, DK31, phylogenetic analysis

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
SEMBOL LİSTESİ.....	viii
ÖNSÖZ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Oleaceae Familyasının Morfolojik Özellikleri.....	2
1.2 <i>Olea europaea</i> L. Türünün Morfolojik Özellikleri.....	2
1.2.1 <i>Olea europaea</i> L. Türünün Sistematikteki Yeri.....	3
1.2.2 <i>Olea europaea</i> L. Türü ve Dünya Üzerindeki Yayılışı.....	4
1.2.3 <i>Olea europaea</i> L. Türü Üzerine Yapılan Moleküler Sistematik Çalışmalar.....	5
1.2.4 <i>Olea europaea</i> L. Türünün Ekonomik ve Tıbbi Önemi.....	8
1.3 Moleküler Sistematik.....	10
1.3.1 Markır Tipleri.....	11
1.3.1.1 Morfolojik Markırlar.....	11
1.3.1.2 Biyokimyasal Markırlar.....	11
1.3.1.3 DNA Markırları.....	12
1.3.1.3.1 Hibridizasyon Temelli Moleküler Markırlar.....	13
1.3.1.3.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism-Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi).....	13
1.3.1.3.2 PCR Temelli Moleküler Markırlar.....	13
1.3.1.3.2.1 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA(s) – Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA).....	14
1.3.1.3.2.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism - Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi).....	15
1.3.1.3.2.3 Minisatellitler (VNTR-Variable Number Of Tandem Repeats / Değişken Sayıda Ardışık Tekrarlar) / Mikrosatellitler (SSR-Simple Sequence Repeats / Basit Dizi Tekrarları).....	15
1.3.1.3.2.4 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats - Basit Dizilerarası Tekrarlar).....	16
1.3.1.3.2.5 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions-Diziye Dayalı Çoğaltılmış Bölgeler).....	17
1.3.1.3.2.6 CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequences - Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler).....	17
1.3.1.3.2.7 ESTs (Expressed Sequence Tags - İfade Edilen Dizi İşaretleri / Markırlar).....	18
1.3.1.3.2.8 SNP (Single Nucleotide Polymorphism -Tek Nükleotit Polimorfizmi).....	18

1.3.1.3.2.9	SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism -Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi)	18
1.3.1.3.2.10	SRAP (Sequence Related Amplified Polimorphism-Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm)	19
1.3.2	ITS (Internal Transcribed Spacers-Transkribe Edilmiş İç Ayırıcılar) ve nrDNA	19
1.3.2.1	ITS Bölgesi ve Genel Özellikleri	19
1.3.2.2	ITS Bölgesinin Filogenetik Kullanışlılığı	22
1.3.3	DNA Dizileme	23
1.3.3.1	Maxam ve Gilbert'in DNA Kimyasal Kırılma (DNA Sequencing) Yöntemi	23
1.3.3.2	Sanger Dizileme (Cycle Sequencing) Yöntemi	24
1.3.3.3	Otomatik DNA Dizileme Yöntemi (Automated Sequencing)	25
1.3.3.4	Çoklu Dizi Hizalama ve Clustal W Programı	26
1.3.4	Filogenetik Analiz	26
1.3.4.1	Filogenetik Ağaç	27
1.3.4.1.1	Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler	28
1.3.4.1.1.1	Karakter Temelli Yöntemler	28
1.3.4.1.1.1.1	Maximum Parsimoni (MP), Farklılıkları En Aza İndirme (Tutumluluk) Yöntemi	28
1.3.4.1.1.1.2	Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood-ML) veya En Yüksek İhtimal Yöntemi	30
1.3.4.1.1.1.3	Bayes Yöntemi	30
1.3.4.1.1.2	Mesafe Temelli Yöntemler	30
1.3.4.1.1.2.1	UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means) Metodu	31
1.3.4.1.1.2.2	NJ (Neighbour Joining) Metodu	31
1.3.4.1.2	Filogenetik Ağaçların Oluşturulmasında Kullanılan Programlar	32
1.3.4.1.2.1	PAUP* (*:Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods / Parsimoni ve Diğer Metotlar Kullanılarak Yapılan Filogenetik Analiz)	32
1.3.4.1.2.2	Mr. Bayes (Bayesian Inference of Phylogeny)	33
1.3.4.1.2.3	PHYLIP (The Phylogeny Inference Package)	33
1.4	Çalışmanın Amacı	33
2.	MATERYAL VE YÖNTEM	35
2.1	Materyal	35
2.1.1	Çalışmada Kullanılan Bitki Örnekleri	35
2.1.2	Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması ..	35
2.1.3	Kullanılan Kimyasallar	35
2.1.3.1	Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar	36
2.1.3.1.1	Fenol-Kloroform-İzoamilalkol Metoduyla Yapılan DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar	36
2.1.3.2	PCR'de Kullanılan Kimyasallar	37
2.1.3.3	Agaroz Jel Elektroforez Tamponları	38
2.2	Yöntem	39

2.2.1	Zeytin Total Genomik DNA İzolasyonu.....	39
2.2.1.1	Fenol-Kloroform-İzoamilalkol Protokolü.....	39
2.2.2	DNA'nın Saflığının Belirlenmesi.....	40
2.2.3	PCR Reaksiyonlarının Yapılışı.....	40
2.2.4	Agaroz Jel Elektroforezi.....	41
2.2.5	Dizileme ve Dizi Analizi.....	42
2.2.6	Filogenetik Analiz.....	42
3.	BULGULAR.....	43
3.1	Bitki Materyallerinin Toplanması.....	43
3.2	DNA İzolasyonu.....	44
3.3	PCR Reaksiyonları.....	45
3.4	DNA Dizileme ve Dizi Analizi.....	46
3.4.1	Dizileme Reaksiyonları.....	46
3.5	Ham Verilerin Filogenetik Analize Hazırlanması.....	47
3.5.1	Dizilerin İşlenmesi.....	47
3.5.2	Dizilerin Hizalanması.....	47
3.6	Filogenetik Analiz.....	47
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
5.	KAYNAKLAR.....	62
6.	EKLER.....	68
6.1	EK A Çalışmada Kullanılan Primerlerin Referansları.....	68
6.2	EK B ClustalW'da Hizalanmış ITS5A nrDNA Dizisinin Veri Matrisi.....	69
6.3	EK C ClustalW'da Hizalanmış DK31 Dizisinin Veri Matrisi.....	73

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: ITS bölgesinin temel yapısı ve evrensel ITS primerlerinin rDNA üzerindeki bağlanma bölgeleri	21
Şekil 1.2: Dizi analizi sonucu oluşan piklerin görüntüsü	25
Şekil 3.1: Zeytin çeşitlerine ait gDNA'ların agaroz jel görüntüsü	44
Şekil 3.2: Zeytin çeşitlerine ait gDNA'ların agaroz jel görüntüsü	44
Şekil 3.3: DNA moleküler ağırlık markırı ve ITS bölgesine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	45
Şekil 3.4: ITS bölgesine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	45
Şekil 3.5: DK31 bölgesine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	46
Şekil 3.6: DK31 bölgesine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	46
Şekil 4.1: ITS bölgesine ait diziler kullanılarak oluşturulan 1 numaralı ağaç	50
Şekil 4.2: Parsimoni ile elde edilen 1000 ağacın strict konsensusu.....	51
Şekil 4.3: ITS dizilerine ait bootstrap analizi sonucunda oluşan parsimoni ağacı	52
Şekil 4.4: Parsimoni kriteri kullanılarak elde edilen 1, 2, 3 ve 4 numaralı ağaçlar	53
Şekil 4.5: Parsimoni kriteri kullanılarak oluşturulan 9, 10, 100 ve 1000 numaralı ağaçlar.....	54
Şekil 4.6: Parsimoni kriteri kullanılarak elde edilen 5000, 10000 ve 16383 numaralı ağaçlar	55
Şekil 4.7: Parsimoni ile elde edilen 16383 ağacın Strict ve semi-strict konsensusu	56
Şekil 4.8: Parsimoni ile elde edilen 16383 ağacın Majority rule ağacı	57
Şekil 4.9: Bootstrap analizi sonucunda oluşan parsimoni ağacı	58
Şekil 4.10: UPGMA Analizi sonucunda oluşan ağaç	59
Şekil 4.11: Neighbor-Joining (NJ) Analizi sonucunda oluşan ağaç	60

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar ve Konsantrasyonları.....	36
Tablo 2.2: PCR'da kullanılan primerler, konsantrasyonları ve Tm değerleri* ...	37
Tablo 2.3: PCR'da kullanılan bileşenler, miktarları ve konsantrasyonları	38
Tablo 2.4: 5X TBE tamponu hazırlama	38
Tablo 2.5: PCR döngü koşulları	41

SEMBOL LİSTESİ

- PCR** : Polimeraz Zincir Reaksiyonu
- RFLP** : Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
- RAPD** : Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
- AFLP** : Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
- SSR** : Basit Dizi Tekrarları
- VNTRs** : Çeşitli Sayıda Ardışık Tekrarlar
- ISSR** : Basit İç Dizi Tekrarları
- SCAR** : Belirlenmiş ve Çoğaltılmış Polimorfik Diziler
- CAPS** : Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler
- ESTs** : İşaretli İfade Edilen Diziler
- ASAP** : Allele Özgü Birleşen Primerler
- SNP** : Tek Nükleotit Polimorfizmi
- SSCP** : Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizm
- STS** : Dizisi Etiketlenmiş Alanlar
- SRAP** : Diziye İlişkin Çoğaltılmış Polimorfizm
- ITS** : Internal Transcribed Spacer / Transkribe Edilmiş İç Ayırıcı Diziler
- cDNA** : Complementary DNA (Komplementer DNA)
- dNTP** : Deoksiribonükleosid Trifosfat
- ddNTP** : Dideoksiribonükleosid Trifosfat
- DMSO** : Dimetil Sülfoksit
- DNA** : Deoksiribo Nükleik Asit
- mtDNA** : Mitokondri DNA'sı
- Taq** : *Thermus aquaticus*

- gDNA** : Genomik DNA
- TE** : Tris-EDTA
- EDTA** : Etilendiamintetraasetik Asit
- MP** : Maximum Parsimoni
- ML** : Maximum Likelihood (Maksimum Olasılık)
- PAUP*** : Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods Programs
- PHYLIP** : The Phylogeny Inference Package Programs
- bp** : Baz Çifti
- DNA** : Deoksiribonükleik Asit
- ETS** : External Transcribed Spacer (Transkribe Edilmiş Dış Ayırıcı Diziler)
- IGS** : Intergenic Spacer (Genler Arası Ayırıcı)
- mat K** : *Maturase K* geni
- cpDNA** : Kloroplast DNA
- NOR** : Nükleolar Organizer Region
- nrDNA** : Nüklear Ribozomal DNA
- SSU** : Small Subunit
- ETOH** : Etil Alkol / Etanol
- rpm** : Dakikadaki Döngü Sayısı
- TBE** : Tris-Borikasıit- EDTA
- UPGMA** : Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Avarage
- NJ** : Neighbour Joining
- MEGA** : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Programs
- dH2O** : Distile Su
- NaCl** : Sodyum Klorür
- NaAc** : Sodyum Asetat

- L.** : Linne
- T_m** : Erime Sıcaklıkları
- NCBI** : National Center For Biotechnology Information
- MgCl₂** : Magnezyum Klorür
- AP-PCR:** Arbitrary Primed-PCR

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana her türlü desteği sağlayan, tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren, gerektiğinde hem arkadaş hem de baba gibi davranan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Fatih COŞKUN'a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Kullanılan bitki materyallerini temin eden Uludağ Üniversitesi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Sevcan ÇELENK'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca kimyasal ve sarf malzeme sıkıntısı olduğu zamanlarda yardımına yetişen, gerek ders aşamasında, gerekse günlük hayatta bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren Sayın Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimim sayesinde tanışma fırsatı bulduğum, en zor anlarımda yanımda olan, beraber gülüp beraber ağladığımız, kısa zamanda çok şey paylaştığım değerli dostlarım Tuğba ÇAKMAK ve Özge TOK'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bir arada hoş vakit geçirdiğimiz, laboratuvar çalışmalarım sırasında benden bilgisini, yardımlarını ve arkadaşlığını esirgemeyen Araş. Gör. Dr. Görkem DENİZ SÖNMEZ, Dr. Öznur SUAKAR, Araş. Gör. Şakir AKGÜN, Öğr. Gör. Emre SEVİNDİK, Araş. Gör. Taner ÖZCAN, Uzman Gülçin ÇETİN, Ayfer ALKAÇ, Veysel UZUN, Özgün SALI ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Deneyisel çalışmalarımın ilk basamağını oluşturan DNA izolasyonunda gerekli olan sıvı azotu temin ettiğim Merkez Araştırma Laboratuvarı'na, özellikle yardımlarını ve arkadaşlığını esirgemeyen merkez çalışanlarından Metin GÜL'e teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca bana ilgi ve fedakarlık göstererek, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Zeytin (*Olea europaea* L.) ; Oleaceae familyasında yer alan, yaklaşık 20-25 türe sahip, en erken kültüre alınan, yaprak dökmeyen, yavaş büyüyen, kuraklık stresine duyarlı ve tahmini 500 yıl gibi son derece uzun yıllar yaşayan bir ağaçtır [1]. Oleaceae familyasının tarımsal olarak en önemli türüdür. Zeytin ağacının yaprakları, yağı ve meyvesi besleyici, tedavi edici ve kutlamalardaki kullanımıyla zengin bir tarihe sahiptir [2].

Anadolu'da yetiştiriciliği yapılan birçok zeytin (*Olea europaea* L.) çeşidi bulunduğu halde bunların morfolojik ve biyolojik özellikleri henüz tam olarak belirlenmiş değildir. Bunlardan çok az bir kısmının özellikleri belirlenmiş olduğu halde, bunların da içlerinde genotipik veya fenotipik nedenlere bağlı varyasyonların olduğu gözlenmektedir. Günümüzde bu tür problemlerin çözümünde moleküler sistematik çalışmalarının önemli katkılar sağladığı bilinmektedir [3].

Taksonların nrDNA ITS bölgeleri; uzun zamandır bitki taksonları arasındaki alt düzeydeki filogenetik ilişkilerin çalışılmasında temel bir veri kaynağı olarak kullanılmaktadır [4]. Bitkilerdeki genetik çeşitliliğinin ortaya konmasında, bitki türleri arasındaki taksonomik ve filogenetik ilişkilerin doğru bir şekilde belirlenmesinde başarıyla kullanılmaktadırlar. Polimorfizmleri ortaya çıkarma özelliği ve kolaylıkla çoğaltılıp dizilenebildiğinden angiospermelerin filogenetik analizinde büyük çapta kullanılmaktadırlar [5]. Nüklear ribosomal DNA'nın filogenetik kullanımı geniş bir taksonomik alan kapsıyor olmasına rağmen; bazen uzak veya yakın ilişkili cinsler arasındaki ilişkileri anlamada oldukça yetersiz kalmaktadır. Bu durumda; bitki filogenetik çalışmaları için kullanılan birkaç evrensel moleküler markıra ilaveten, yeni gen markırları rezolasyonu geliştirmek ve doğru bir bitki filogenetik oluşum için oldukça büyük öneme sahiptirler [6]. Bu çalışmanın amacı, Türkiye'de yetişen ve çoğunlukla yağ ve sofralık zeytin üretiminde kullanılan bazı zeytin çeşitleri (*Olea europaea* L. cv. Gemlik ve *Olea europaea* L. cv. Çelebi) arasındaki filogenetik ilişkileri anlamak, genomik DNA bölgelerindeki nükleotit

varyasyonlarını değerlendirmek, çeşit içi filogenetik ilişkileri aydınlatmak ve daha sonra gerçekleştirilebilecek çalışmalara sağlam bir zemin oluşturmaktır.

1.1 Oleaceae Familyasının Morfolojik zellikleri

Her dem yeşil veya yarı-yaprak döken ağaçlar ve alırlardır. Dallar; 0.5-2 m uzunluğunda, ince, dik ya da yayılmış, köşeli, koyu yeşil ve pürüzsüzdür. Yapraklar alternat, 3 parçacıklı, nadiren 1, ovat, dikdörtgen veya dikdörtgen-spatula, 0.7-2(-3) cm, geniş, kama şeklinde, siliolat. Çiçekler; hipogin ve tetramerdir (genellikle 2 stamenli, yalnızca birkaç türü 4 stamenli). Temel iek durumu kimz, kısa lateral kollarda 2-5 çiçeklidir. Kaliks; 5 loplu, an şekilli ve dişlidir. Korolla; aktinomorfik ve genellikle simpetalus, sarı, parçaları 12-15 mm çapında, 5 loplu, loplar dikdörtgen, nadiren tüpten daha kısadır. Meyve; küresel, 7-9 mm, parlak siyah veya koyu mavi-morumsudur [7-8].

1.2 *Olea europaea* L. Türünün Morfolojik zellikleri

Zeytin geniş bir taca sahip, uzun ömürlü alırlar ya da ağaçlardır. Genellikle sık budaklı gövde ve düzgün yuvarlak dallar ya da sık dallanmış, 2 m uzunluğunda, 4 köşeli dikenli dallara sahip alırlar; dallar lepidot, gri; tomurcuklar çok küçük, lepidot ince tüylü grimsidir. Yapraklar mızraksı, kısa saplı, yaprak kenarları alt yzeyeye doğru hafif kıvrımlı, yaprak ucunda sivri bir çıkıntı bulunur. Yaprak st tüysüz, alt yoğun olarak gümüşi-lepidotdur. Panikula; yapraklardan daha kısadır. Çiçekler beyaz, kokulu, 3-4 mm'dir. Kaliks; küçük, kısa tüplü, 4 loblu, genellikle kısa veya geniş bir şekilde üçgen açılıdır. Korolla; simpetalus, kısa tüplü, valvat ya da bazen birbirine geçmiş durumdadır. Stamenler; 2 tane, korolla tüpünün tepesine bağlı, filamentler kısa, anterler elipsoid, eksertus ve lateral bir şekilde kendiliğinden açılır. Ovaryum; st durumlu, şişe şekilli veya konoid, 2 gzly, her bir lokusta birbirine bağlı 2 ovll, stilus genellikle kısa, stigma terminal, 2 loblu ya da değil. Sert

çekirdekli meyve; 0.5-4 cm boyutunda, 1 tohumlu, endokarp genellikle dayanıklı, mezokarp sıklıkla ince ya da kalın ve etli, önce yeşil olgunlaştıktan sonra koyu mor veya siyah renge döner [7, 9-10].

1.2.1 *Olea europaea* L. Türünün Sistematikteki Yeri

Zeytin (*Olea europaea* L.); nükleer ve organel genomik dizilerinin çoğu bilinmeyen Asterid kladı içinde yer alan, 30 cins ve 600 türden oluşan monofiletik Oleaceae familyasına ait kültürü yapılan bir türdür. Morfolojik ve coğrafik özellikler temel alınarak yapılan revizyon çalışmalarına göre: altı tür içerdiği tespit edilmiştir. Yabani zeytin (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) ve kültürü yapılan zeytin (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) alt tür *europaea*'nın iki farklı formudur [10-13].

Regnum	:	Plantae /Vegetabile
Divisio	:	Spermatophyta
Subdivisio	:	Angiospermae
Classis	:	Magnoliopsida
Subclass	:	Asteridae
Ordo	:	Lamiales
Familia	:	Oleacea
Genus	:	<i>Olea</i>
Subgenus	:	<i>Olea europaea</i> L.

1.2.2 *Olea europaea* L. Türü ve Dünya Üzerindeki Yayılışı

Zeytin (*Olea europaea* L.); Oleaceae familyasının tarımsal olarak en önemli türü ve çok çeşitli çevresel koşullara kolaylıkla uyum sağlayabilen bir ağaçtır [14-15]. Kültüre edilen bu tür; vejetatif üreme, kültür-yabani formlar arasındaki rastgele çaprazlama yöntemi ile çoğalırlar. Zamanla oluşan mutasyon birikimleri ve çaprazlama yöntemleri çeşitliliğin artmasına yol açar. Bundan dolayı çoğu zeytin çeşitleri lokal bir orijine sahiptirler. Lokal orijinlerinden dolayı, spesifik zeytin çeşitleri özel coğrafik bölgelerde doğal olarak yetiştirilmektedirler [16-17].

Dünya çapında 800 milyondan daha fazla zeytin ağacı yetiştirilmektedir. Uluslar arası zeytin konseyinin raporlarına göre: tahmin edilen yaklaşık 10.000.000 hektarlık Dünya Zeytin Kültürünün yaklaşık %97'sini Akdeniz ülkeleri oluşturmaktadır [11]. FAQ'ya göre: Akdeniz ülkeleri dünyadaki zeytinin %90'ından daha fazlasını üretmektedirler. Buna göre de: İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Tunus, Fas, Suriye ve Portekiz gibi ülkeler dünyanın en büyük zeytin üreticileridir [15].

Zeytin bitkisinin birkaç bin yıldır Akdeniz Havzası'nda devamlı olarak bulunduğu ve uzun zaman önce kültürleştirildiği çeşitli çalışmalar yoluyla doğrulanmıştır [17]. Bu nedenle zeytinin Akdeniz Bölgesi'nin tipik ve yaygın ağaçlarından biri olduğu kabul edilmektedir [18]. Yine de coğrafi olarak kökeni hala net değildir. Kültür formlarının yabani Mediterran zeytininden kökenlendiği düşünülmektedir ve insan yer değiştirmelerini takiben bütün Akdeniz ülkeleri etrafına dağılmıştır. Bartolini ve ark. (1998), 3000'den daha fazla farklı ismiyle yaklaşık 1200 çeşit zeytin içeren ve 24 ülkede yer alan 79 tane zeytin koleksiyonunun varlığını rapor etmişlerdir [15]. Fakat bu sayının çoğu lokal kültür ve ekotip bilgi eksikliğinden dolayı daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Bu kültürlerin çoğu İtalya (538), İspanya (183), Fransa (88) ve Yunanistan (52) gibi Güney Avrupa ülkelerinden türemiştir [11].

Türkiye'de yetişen zeytinin asıl yayılış alanları Marmara, Ege ve Akdeniz bölgeleridir. Yine de Güney Anadolu ve Karadeniz bölgelerinde de az da olsa yayılış göstermektedir. Türkiye'nin bu bölgeleri içine alan yayılış alanlarında yaklaşık

olarak 100 lokal zeytin kültürüne sahip olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından tahmin edilmektedir [19].

1.2.3 *Olea europaea* L. Türü Üzerine Yapılan Moleküler Sistematik Çalışmalar

Son yıllara kadar zeytin çeşitlerinin tanımlanması yalnızca morfolojik ve agronomik özelliklere bağlı olarak yapılmaktaydı. Zeytin çeşitleri arasındaki çeşitlilik; yaprak şekli, rengi ve meyve morfolojisindeki farklılıklar değerlendirilerek belirlenmiştir. Morfolojideki farklılıkların kolay elde edilmesi, ileri teknolojik gereç gerektirmemesi ve fenotiplerin doğrudan ölçülmesi gibi avantajları vardır. Bu avantajlarına ek olarak; morfolojik ve fenolojik markırlar çevresel bağımlılık ve küçük sayıda polimorfizm taraması gibi dezavantajlara da sahiptirler. Ayrıca fenolojik özelliklerin birkaçı yalnızca zeytin meyvesi veya zeytin ağacı olgunlaşma dönemine girdiğinde elde edilebilirler [9, 15]. Yine de Contini ve ark. (1999), farklı bilinen ve bilinmeyen zeytin çeşitleri arasındaki ve kendi aralarındaki genetik çeşitliliği değerlendirmek için yaprak, meyve ve meyve çekirdeği gibi morfolojik karakterleri kullanmışlardır [14].

Zeytin germplasmında oldukça fazla genetik çeşitliliğinin gözlenmesi ve zeytin çeşitlerinin sinonim isimleri arttığından hızlı ve etkili ayırma teknikleri gerekmektedir [9, 15]. Zeytin (*Olea europaea* L.) ağırlıklı olarak allogamdır. Bu durum yüksek düzeyde heterozigosite ve bireyler arasında gözlenebilen DNA polimorfizmine yol açar. DNA markırlarının kullanımı zeytin çeşitleri arasındaki DNA polimorfizm düzeylerini veren pratik metotlardan bir tanesidir [3]. DNA temelli markırlar; *Olea europaea* türlerinin revizyonu, germplasm karakterizasyonu, üreme programları gibi hem teorik hem de uygulamalı araştırma alanlarında geniş çaplı kullanılmıştır [18]. Moleküler markırlar; zeytin çeşitlerinin tanımlanması, kökenlerinin belirlenmesi ve zeytin yağı pazarlamacılığında ki sahtekarcılığın tespitinde kullanılabilirler. Moleküler markırlar aracılığıyla kültürler arasındaki genetik çeşitliliğin dağılımı ve miktarını anlamak araştırılan çoğu zeytin ağacı için ana hedefdir [10, 17, 20].

Loukas ve Krimbas (1983), zeytinin kültüre edilmesi ile ilgili çalışmalara açıklık getirmek için ilk olarak izozimler ile ilgili çalışma yapmıştır [17]. Ayrıca izozimler zeytin çeşitlerinin tanımlanması amacıyla kullanılan ilk moleküler markır olma özelliği taşımaktadırlar [10].

RAPD moleküler markır tekniği kullanılarak yapılan, zeytin çeşitlerini ayırmaya dayalı ilk çalışma Fabbri ve ark. (1995) tarafından yayınlanmıştır. Bu çalışmada zeytin çeşitleri iki ana gruba ayrılmıştır. Gruplardan biri yağ üretimi için yetiştirilen küçük meyveli çeşitleri, diğer grup ise; büyük meyveli çekirdekleri içermektedir [14]. Dünya Zeytin Germplasm Bankası'ndaki 200'den daha fazla çeşit farklı birkaç RAPD primerleri kullanılarak karakterize edilmiştir [17]. Zeytin germplasm zenginliği, referans eksikliği ve kültür formlarında yapılan yanlışlıklar çeşitliliğin sınıflandırılmasını zorlaştırmaktadır. Bu problemlerin üstesinden gelmek amacıyla son 15 yılda farklı moleküler markırlar kullanılarak kültür formlarının tanımlanması amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. RAPD bu amaç doğrultusunda kullanılan ilk moleküler teknik olma özelliği taşımaktadır. Bu yöntem aynı zamanda iç ve dış kültür çeşitliliğini değerlendirmek için kullanılmıştır. RAPD çalışmaları sayesinde bölgesel ve Akdeniz bölgesi düzeyinde var olan geniş genetik çeşitlilik ortaya çıkarılmıştır [18].

Wallander ve Albert (2000), zeytin kloroplast riboloz 1,5-bifosfat karboksilaz genine ait geniş alt ünitesinin bir kısmının dizisini Oleaceae familyasının sistematik pozisyonunu belirlemek ve diğer cinsler ile karşılaştırmasını yapmak için kullanmışlardır. Benzer şekilde Olmstead ve ark. (2000), zeytin kloroplast *ndhF* genini filogenetik çalışmalar için dizilemişlerdir [17].

Green ve Wickens (1989); Vargas ve ark. tarafından yapılan (2001) taksonomik revizyon çalışmalarına göre; *Olea*'nın çok sayıda tür ve alt-tür içeren zengin bir cins olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda AFLP, RAPD, ISSR, tekrar DNA dizi analizi ve kloroplast-mitokondrial DNA polimorfizm analizlerini içeren birkaç moleküler çalışma *Olea* ve kültüre edilen zeytin filogenisinin aydınlatılmasında büyük katkı sağlamıştır [21].

Genetik çeşitliliği değerlendirmek amacıyla kullanılan RAPD ve RFLP gibi iki teknik, nükleer DNA'da ki polimorfizmleri ortaya çıkarmak için Besnard ve ark. (2001) tarafından uygulanmıştır. Prob olarak zeytine ait intergenic Spacer (IGS)

bölgeleri kullanılarak rDNA varyasyonları çalışılmıştır [22]. RFLP'nin diğer moleküler teknikler ile kombinasyonu zeytin çeşitliliği araştırmalarında büyük çaplı kullanılmıştır. Besnard ve ark. (2002), RFLP tekniğini PCR ile birleştirerek zeytin kloroplast DNA çeşitliliğini analiz etmişlerdir [15].

ISSR markırlarına dayalı yapılan çalışmaların, zeytin meyvesi ve yapraklarının tanımlanmasında kullanılan filogenetik ilişkilerinin değerlendirilmesinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır. ISSR markırları; hem *Olea europaea* L. türleri içindeki filogenetik analizlerde hem de kültüre zeytin formlarının tanımlanmasında uygulanmıştır. Vargas ve Kadereit (2001) tarafında yapılan bir çalışmada, İber Yarımadası'nda ki birkaç zeytin popülasyonunun yabancı durumları doğrulanmıştır. Bu markırlar aynı zamanda 10 adet İtalyan zeytin çeşidini ayırmada başarıyla kullanılmıştır [15].

Belaj ve ark. (2003) tarafından RAPD, ISSR ve AFLP'yi karşılaştırmak için yapılan çalışmada; zeytin kültür genotiplerinin ayırımı için çeşitli tekniklerin kapasitesini değerlendirme hedeflenmiştir. Bunun sonucunda; İki dominant markır sistemi olan RAPD ve AFLP'nin kolaylıkla karşılaştırılabilir olduğu bulunmuş ve sonra ki çalışmalar için en etkili yöntem olarak değerlendirilmiş ve kullanılmışlardır [20]. Rubio de Casas ve ark. (2006), AFLP tekniği ile yapılan filogenetik çalışmalarla Avrupa ve Afrika'da tanımlanan *O. europaea*'yı, monofiletik bir grup olarak tanımlamışlardır [18].

Reale ve ark. (2006), Avrupa ve Avusturya'dan toplanan 65 zeytin örneği genotipi için SNP markırlarını kullanmışlar ve kültürlerin %77'sinde net bir ayırım gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar Genbank veri bankasında ki mevcut zeytin gen dizilerinden ve SRAP (sequence-related amplification polymorphism) metodu kullanarak rastgele örneklerden SNP markırları geliştirmişlerdir [15]. Hem dizi temelli hem de zeytindeki 8 adet SNP'yi tanımlamak için rastgele bir yöntem kullanmışlardır. Parmak-izi yönteminden elde edilen dizileri dizilemişler, birkaç zeytin kültür formunu spesifik primerler ile çoğaltmışlar ve sonra polimorfizm tespiti için karşılaştırma yapmışlardır [18].

Zeytin genomunda yer alan retrotranspozon benzeri elementlerin varlığı; 2001 yılında Hernández ve arkadaşları tarafından yapılan zeytinin kültür formlarının

tanımlanması amacıyla kullanılan SCAR yöntemi sırasında ortaya çıkarılmıştır. Retrotranspozonların zeytin genetik kararsızlığı ve genom evriminde önemli bir rol oynadıkları kabul edilmektedir. Retrotranspozon dizileri moleküler markır oluşturmak için 2007 yılında Natali ve ark. tarafından kullanılmıştır [15].

Genetik analiz için nükleer mikrosatelit markır kullanımı zeytinde uzun zamandır var olan bir durumdur. Bu uygulama kloroplast ve mitokondri genomlarını da içine alacak şekilde genişletilmiştir. DNA amplifikasyon teknolojisine dayalı birkaç markır genetik çeşitliliği yapılandırmak için kültür zeytinleri arasındaki genetik ilişkileri araştırmaya yönelik kullanılmaktadır [23].

Ülkemizde yetişen *Olea europaea* L. türüne ait çeşitler hakkında DNA dizilerine dayalı olarak yapılmış (ITS5A, ITS4 ve polimorfik gen bölgesi) herhangi bir moleküler filogenetik çalışma mevcut değildir. *Olea europaea* L. cv. Gemlik ve *Olea europaea* L. cv. Çelebi çeşitlerine ait, iki farklı lokasyondan toplanan iki çeşide ait 16 örneğin seçilen gen bölgesi (ITS ve DK31) açısından polimorfizm analizi yapıldı ve bunlara dayalı filogenetik ağaçlar oluşturuldu.

1.2.4 *Olea europaea* L. Türünün Ekonomik ve Tıbbi Önemi

Zeytin çeşitleri temel olarak yağlık ve sofralık olarak değerlendirilirken; yaklaşık olarak %90'ından daha fazlası yağ, geriye kalan yüzdelik kısmı da sofralık zeytin amaçlı yetiştirilmektedir [11]. İnsanoğlu zeytinin meyvesinin yanı sıra zeytinyağından kozmetik sanayide ve tıp alanında da yüzyıllardır faydalanmaktadır. Ayrıca odunu eskiden direk ve kapı yapımında kullanılırken, günümüzde kanal yapımında çoğu zaman tercih edilmekte ve tohumları da tesbih yapımında kullanılmaktadır.

Zeytin, *Olea europaea* L., dünyanın en önemli ekonomik bitkisinden biridir. Dünyada 37 ülkede ekonomik anlamda zeytin üretimi yapılmakta ve 9.8 milyon hektar dünya zeytin üretim alanlarının %95'inin Akdeniz bölgesinde yer aldığı görülmektedir [9]. Zeytinin ekonomik anlamda yetiştiriciliği yapılan 37 ülke arasında Türkiye büyük bir öneme sahip ve zeytin çeşitliliği açısından oldukça zengindir. Ülke için önemli bir gelir kaynağı ve ekonomiye büyük ölçüde katkı

sağlamaktadır [24]. Zeytin Türkiye’de büyük ticari öneme sahiptir [19]. Türkiye zeytinyağının büyük bir kısmını ihraç eder [19]. FAO tarafından yayınlanan istatistiklere göre; Türkiye dünyada zeytinyağı üretiminde İspanya, İtalya ve Yunanistan’dan sonra dördüncü sırada yer almaktadır. Ana zeytinyağı üreticileri Avrupa ülkeleri olmasına rağmen, Türkiye de yaklaşık 160000 tonluk zeytinyağı üretimi ile bu pazarda yer almaktadır. Türkiye bu ihracatın yaklaşık 38000 tonluk bir kısmını karşılamaktadır [2, 11, 19]. Ayrıca sofralık siyah zeytinin %80’i Türkiye’de üretilmektedir. Türkiye taze zeytin üretiminde dördüncü sırada yer almaktadır ve sofralık zeytin üretiminde İspanya’dan sonra en büyük ikinci üretici konumundadır [2, 19].

Zeytin çoğunlukla meyve mezokarpında yağ biriktirir ve yağ içeriği total mezokarp ağırlığının %28-30’una kadar ulaşabilir [12]. Bu sebeple yağ elde etmek için meyveyi belirli işlemlere tabi tutmak gerekmektedir. Zeytin meyvesindeki metabolitler ve yağ elde etmek için meyvenin işleme prosesi esnasında oluşan dönüşümler sayesinde, zeytinyağı doğal aromasına kavuşmaktadır. Doğal zeytinyağı; hiçbir kimyasal ile müdahale edilmeden elde edilen, organik ve besinsel özelliklerinin dışında doğal bir meyve suyudur [25].

Zeytinyağı eşsiz bir açıl kompozisyonu gösterir. Linoleik (C18:2), palmitik (C16:0), stearik (C18:0) ve linolenik (C18:3) minor bileşenler olarak temsil ediliyor iken; oleik total yağ asitlerinin %75-80’ine kadar ulaşabilmektedir. Oleik asit zeytinyağının %55-83’ünü kapsayan önemli bir yağ asididir. Linoleik asit ise; %3.5-21’lik kısmı kapsamaktadır. Yağ asitleri ve aromatik özelliğini sağlayan minor bileşenler zeytin yağını diğer bitkisel yağlar arasında eşsiz yapan iki temel bileşendir [2, 12]. Birkaç minor bileşenin (beslenmede kullanılan diğer bütün sebze yağlarından zeytinyağını farklı kılan) insan sağlığı üzerinde önemli etkileri olduğu görülür. Sekoiridoid olarak isimlendirilen bu bileşenler zeytin fenoliklerinin en önemli sınıfını temsil eder ve yalnızca *Olea europaea* L.’yi içeren *Oleaceae* familyasında mevcuttur [18]. Zeytinyağı açıl kompozisyonu; çeşitleri arasında da önemli derecede çeşitlilik göstermektedir [2, 12]. Yağ asitleri ve tokoferoller; doğal zeytinyağının besinsel, teknolojik ve oksidatif kararlılık gibi özellikleri ile yakından ilgilidirler. Fenolik bileşikler; uçucu zeytinyağının kalitesi, besinsel değeri, teknolojik ve organoleptik özellikleri açısından oldukça önemlidirler. İleride tarımsal üretim için

optimal dengeyi belirlemede yardımcı olacak önemli bilgilerden bir tanesidir [25]. Tüm bu değerli özelliklerinden dolayı zeytinyağı; farmasötik, endüstriyel ve tüketiciye özel bazı amaçlar için kullanılmaktadır [12, 23].

Bitkisel çayların sağlıklı yaşam üzerine büyük bir etkisi olduğu yönündeki çalışmalar büyük ilgi görmektedir. Bundan dolayıdır ki; zeytin yaprakları ile ilgili çalışmalar artmış ve çeşitli çalışmalarda zeytin yapraklarının antioksidan, hipoglisemik, anti-hipertansiyon ve antimikrobiyal etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Zeytin yaprakları; hipertansiyon, kardiovasküler hastalıklar ve hiperlipidemi gibi hastalıklara karşı koruma ve iyileştirme etkisine sahiptirler. Ayrıca diyabetik hiperglisemi, hipertansiyon ve enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için tıbbi bir bitki olarak da kullanılmışlardır [2].

1.3 Moleküler Sistemik

Moleküler sistemik; filogenetik ilişkileri yeniden oluşturmak için moleküler verileri içeren bilgilerin kullanımı olarak tanımlanabilir [26]. Özellikle daha önceden bilinen ve klasik taksonomik yöntemlerle çözüme kavuşturulamayan birçok sistemik problem, moleküler verilerden elde edilen bulgular sayesinde çözülmektedir. Moleküler bitki sistematiği çalışmalarında hem nükleer hem de organellar genom moleküler veri kaynağı olarak kullanılabilir. Mitokondri DNA'sı oldukça değişken olduğu için sistemik çalışmalarında genellikle potansiyel bir veri kaynağı olarak ihmal edilmektedir [27]. Bitki tür düzeyindeki filogenetik analizlerin büyük çoğunluğu kodlama yapmayan cpDNA, nrDNA internal transcribed spacer (ITS) bölgesine (ITS1, 5.8S ve ITS2) dayalı olarak yapılmaktadır. Bu bölgeler düşük taksonomik düzeylerde oldukça değişken ve evrensel primerler kullanılarak kolaylıkla çoğaltılabilmektedirler [28-29].

Kloroplast DNA'sı yapısal olarak kararlı, haploid, rekombinant değil, genellikle angiospermelerde uniparental olarak kalıtım gibi özellikler ile karakterize edilmektedir. Bütün bu özellikler sistemik çalışmalarında kullanımını kolaylaştırmaktadır. Yakın ilişkili türler arasında Kloroplast DNA dizileri gen içeriği ve düzenlenmesi açısından oldukça korunmuştur. Bitkilerde kloroplast genomu oldukça hızlı oranda evrimleşmektedir. Kodlama bölgeleri, kodlama yapmayan

bölgelerden daha yavaş evrimleşir. Bu sebeple cpDNA gen dizileri (rbcL, atpB, matK ve ndhf) yoğun olarak familya ve yukarı taksonomik düzeyde kullanılmaktadır. Kodlama yapan bölgelerin aksine kodlama yapmayan bölgeler, daha düşük taksonomik düzeylerde sıklıkla kullanılmaktadırlar [27]. Diğer yandan nükleer ribosomal DNA (nrDNA)'nın ITS bölgeleri; polimorfizmleri ortaya çıkarma ve kolaylıkla çoğaltılıp dizilenebildiğinden son on yılda angiospermilerin analizinde büyük çapta kullanılmaktadırlar [5]. nrDNA'nın ITS bölgesi aynı cinse ait türler ve yakın ilişkili cinsler arasındaki ilişkilerin anlaşılmasına son derece büyük katkı sağlamaktadırlar [6].

1.3.1 Markır Tipleri

1.3.1.1 Morfolojik Markırlar

Tek lokus ile idare edilen morfolojik özellikler, değişik çevre koşullarında ifade edilebildiği sürece genetik markır olarak kullanılabilir. Populasyonların genetik yapısının belirlenmesine yönelik yapılan ilk çalışmalar morfolojik özelliklere dayanmaktadır. Morfolojiden gelen bulgular her ne kadar populasyonların ayırt edilmesinde kullanılmışsa da, genotip-çevre etkileşimleri ve bir genin birden fazla lokus tarafından belirlenmesi gibi durumlardan dolayı morfoloji yeterli olmamaktadır. Tüm bu nedenlere ek olarak; genetik çeşitliliğin tamamının morfolojiye yansımaması da eklenebilir. Morfolojik karakterler kullanılarak yapılan çalışmalar günümüzde geliştirilmiş tekniklerle yapılan çalışmalara göre daha az sayıdadır. Ayrıca ciddi uzmanlık ve bilgi birikimi de gerekmektedir [30].

1.3.1.2 Biyokimyasal Markırlar

Biyokimyasal markırlar, genlerin ürettikleri proteinlerdir. İzoenzimler farklı olarak yüklenmiş proteinlerdir. Elektroforez tekniği kullanılarak kolayca ayrılabilirler. Enzimler özellikli biyokimyasal reaksiyonları katalizlerler. Belirli enzimlerin substrat ve kofaktörleri eklenerek jel üzerinde görülmesi sağlanır ve enzimatik reaksiyonların ürünleri renkli olarak üretilir. Renkli ürünler jel üzerinde görülür bantlar oluşturur. Bu bantlar genetik temellere sahiptir ve kodominant markır

olarak genetik bilgi sağlar. Bununla birlikte morfolojik karakterlere göre çok daha yaygın kullanılmakla birlikte izoenzim lokuslarının azlığı ve bazı enzim sistemlerinin çevre koşullarından etkileniyor olması kullanımlarını sınırlar.

1.3.1.3 DNA Markırları

Farklı çevresel koşullarda yaşayan aynı organizmalar oldukça sık birbirinden farklı değişimler gösterebilirler, böylece aynı türlere ait organizmalar farklı morfolojik ve anatomik özellikler sergileyebilirler. Morfolojik olarak ortaya çıkan çeşitlilik, genetik çeşitliliğin sadece küçük bir yüzdesini oluşturduğu gibi, genetik çeşitliliğin büyük bir kısmı da morfolojiye yansımamaktadır. Morfolojiden elde edilen bulgular genetik farklılıkları belirlemekte kullanılsa da genotip ve çevre arasındaki karşılıklı etkileşim, bir karakterin birden fazla lokus tarafından belirlenmesi ve bir genin birden fazla karakteri etki altına alması gibi nedenlerden dolayı her zaman yeterli olmamaktadır. Bu sebeple DNA'ya bağlı olarak gelişmiş olan moleküler teknolojiler ve moleküler markırlar; bu gibi problemlere çözüm oluşturan, DNA seviyesindeki polimorfizmleri ortaya çıkaran ve tohumlu bitkilerin gelişiminde ve genetik çalışmalarında büyük çapta kullanılan yararlı araçlardır [15].

Kahl'a (2004) göre moleküler markır; baz dizisi farklı organizmalarda polimorfik olan herhangi bir DNA segmentidir [15]. Filogenileri yeniden oluşturmak için DNA dizi verilerinin avantajlarından biri, oluşturulabilen sınırsız sayıda karakterdir [28]. Bu nedenle moleküler markırların geleneksel fenotipe dayalı sistematik çalışmalarının aksine çok sayıda avantaja sahip oldukları söylenebilir [15]. İdeal bir moleküler markır tekniği bazı ölçütlere sahip olmalıdır: (1) Polimorfik olmalı ve genom boyunca eşit olarak dağılmalıdır. (2) Genetik farklılıkların yeterli bir ayrımını sağlamalıdır. (3) Çoklu, bağımsız ve güvenilir markır oluşturmalıdır. (4) Basit, hızlı ve ucuz olmalıdır. (5) DNA veya doku örneğinden küçük miktar gerekmemelidir. (6) Farklı fenotipler ile bağlantılı olmalıdır. (7) Organizmanın genomu ile ilgili ön bilgi gerekmemelidir [31].

Moleküler markır teknikleri; genomdaki dağılımı, taranılan polimorfizm düzeyi, lokus spesifitesi, tekrarlanabilirliği, teknik gereklilikler ve maliyet gibi önemli özellikler açısından birbirlerinden oldukça farklıdırlar [31]. Moleküler markırlar iki temel kategori içinde sınıflandırılabilirler: hibridizasyon temelli moleküler markırlar (RFLP) ve PCR-temelli moleküler markırlar (RAPD, AFLP, ISSR, SSR) [11].

1.3.1.3.1 Hibridizasyon Temelli Moleküler Markırlar

1.3.1.3.1.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism- Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi)

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi; bilinen spesifik restriksiyon enzimleri ile DNA dizisinin parçalanmasıyla oluşan desenlerin analizine ve spesifik problemler ile hibridizasyonuna dayanan moleküler markır tekniğidir [15]. RFLP tekniği; türler, cinsler ve hatta familyalar arasında transferi mümkün olan, güvenilir ve heterozigot bireylerin de karakterize edilmesine olanak sağlayan eş baksım (kodominant) özelliktedir. Tüm bu özelliklerine rağmen RFLP tekniği; zaman kaybı, radyoaktif / toksik kimyasal kullanımı ve bol miktarda saf DNA gereksinimi gibi birkaç sınırlandırıcı kullanımından dolayı günümüzde çok yaygın bir şekilde kullanılmamaktadır [31].

1.3.1.3.2 PCR Temelli Moleküler Markırlar

PCR teknolojisinin (Mullis ve Faloona 1987) keşfinden sonra PCR dayalı çok fazla moleküler markır tekniği geliştirilmiştir [31]. PCR reaksiyonu; yüksek sıcaklıkta enzimatik aktivite gösteren termostabil DNA polimerazın özel DNA bölgesini uygun oligonükleotid primerler kullanarak in vitro şartlarda çoğaltması prensibine dayanmaktadır. Kullanılan oligonükleotid primerleri genellikle 10-25bp uzunluğunda ve genomda bağlandıkları yerlerin arasını eğer 3-4 kb'nin altında olursa

1-1.5 milyon defa çoğaltırlar. Genomdaki değişik yerlerdeki polimorfizmi bulmak için primerler değişik şekillerde tasarlanabilir. Birkaç farklı primer düzenlemeleri yapılarak farklı markırlar geliştirilebilmektedir [32].

1.3.1.3.2.1 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA(s) – Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

Bu teknik birbirinden bağımsız olarak Williams ve Welsh & McClelland adında farklı iki bilim adamı grubu tarafından geliştirilmiştir. Welsh ve McClelland bu tekniğe AP-PCR (Arbitrary Primed-PCR) adını vermiş fakat iki teknik de prensip olarak aynıdır. 1990 yılında iki araştırmacı grubu özgül nükleotid dizisini bilmeye gerek kalmadan PCR ile rastgele bir primer kullanarak polimorfizmlerin saptanabileceğini bulmuşlardır. Literatüre RAPD olarak geçen bu teknik; 9-10 baz çifti uzunluğundaki rastgele oligonükleotidlerin (primerlerin), DNA'nın iki iplikçigi üzerinde, birbirine karşıt iki farklı noktada tamamlayıcılarını bulması ve bu ara bölgenin çoğaltılması esasına dayanır. Primer bağlanma noktalarındaki mutasyon veya dizi değişikliklerinin sonucunda amplifikasyon bantlarının varlığı ya da yokluğuna bakılarak polimorfizm tespit edilir. Genom boyunca rastgele bir şekilde polimorfizmin ortaya çıkarılmasında oldukça duyarlı ve etkili bir tekniktir [15].

RAPD yönteminin en önemli dezavantajı, markırın dominant olması sebebiyle heterozigotları teşhis etmenin zor olmasıdır. Reaksiyon birçok hassas değişkenle birbirine bağlı olduğu için, elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği düşüktür. Yine de RAPD tekniği; çabuk sonuç vermesi, ucuz olması, yüksek ayırım gücü, az işgücü gerektirmesi, az miktarda ve düşük kalitede DNA'ya ihtiyaç duyulması gibi özelliklerinden dolayı popüler hale gelmiştir [15]. RAPD markırı, hızlı ve düşük maliyetli moleküler markır tekniği olarak günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır [3].

1.3.1.3.2.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism - Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)

Zabeau ve Vos tarafından 1993'de geliştirilen AFLP tekniği, Keygene NV tarafından patentlenmiştir [33]. AFLP tekniği, PCR amplifikasyonları ile genomik restriksiyon parçaları arasındaki çeşitliliğin taranması esasına dayanır. Prosedür; iki restriksiyon enzimi ile genomik DNA'nın çift parçalanmasından oluşmaktadır. Kesilen parçaların ucuna nükleotid dizilişi bilinen kısa sentetik DNA'lar eklenir. Bu sentetik DNA'nın nükleotid dizilişini de taşıyan başlatıcı DNA'ların kullanımıyla spesifik olan DNA çoğaltılır [15].

Bu teknik yakın ilişkili genotipler arasındaki polimorfizm taramalarında oldukça kullanışlıdır [15]. Bir jeldeki çok sayıda bant son derece etkili bir teknik olan AFLP ile aynı anda analiz edilebilir. PCR temelli diğer teknikler ile karşılaştırıldığında polimorfizm araştırılması için çok sayıda lokusu tarama kapasitesine sahiptir. Bir reaksiyonda taranabilen polimorfizm sayısı oldukça fazladır. AFLP tekniği tekrarlanabilirlik ve bir reaksiyonda çoğaltılabilen dizi sayısı açısından oldukça üstündür. Üretilen markırlar güvenilir, tekrarlanabilir, oldukça kolay ve ucuzdur. Sınırsız sayıda markır basit bir şekilde çeşitli restriksiyon enzimleri ile oluşturulabilir. Tekniğin dezavantajları ise; saf ve yüksek moleküler ağırlıkta DNA'ya gereksinim duyulması, pahalı bir teknik olması, genellikle dominant belirteçler vermesidir. AFLP diğer moleküler temelli teknikler ile karşılaştırıldığında daha fazla avantaja sahiptir. Çok sayıdaki bu avantajları tekniğin kullanımını arttırmaktadır [20, 33].

1.3.1.3.2.3 Minisatellitler (VNTR-Variable Number Of Tandem Repeats / Değişken Sayıda Ardışık Tekrarlar) / Mikrosatellitler (SSR-Simple Sequence Repeats / Basit Dizi Tekrarları)

(AT), (GT), (ATT), (CTT) veya (GATA) gibi nükleotitlerinin n sayısında tekrarlarından oluşurlar. Bu tekrarlar içerdikleri nükleotid sayısına göre mikrosatellit veya minisatellit olarak adlandırılırlar. Nükleotid ünitelerinin tekrar sayısı genotipler arasındaki polimorfizmleri açığa çıkarır [15].

Kısa tekrarlı diziler (Short Tandem Sequences, STSs) veya kısa dizi tekrarları (SSRs) olarak bilinen mikrosatellitler (Litt ve Luty, 1989), tüm ökaryotik genomunda bulunan tekrarlı nükleotid dizileridir. Mikrosatellitler; genellikle 1-6 bp uzunluğunda, yüksek oranda korunmuş, ko-dominant yapısı ve Mendel kurallarına uyması gibi özelliklere sahiptirler. 11-60 bp uzunluğundaki tekrarlardan oluşan minisatellitler (VNTR: Variable Number Tandem Repeats); genellikle kromozomların uç kısımlarında telomere yakın yerlerde bulunurlar [34].

1.3.1.3.2.4 ISSR (Inter Simple Sequence Repeats - Basit Dizilerarası Tekrarlar)

ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats); karşılıklı olarak oryantasyon gösteren mikrosatelit bölgeleri arasında yer alan yaklaşık olarak 100-3.000 bp büyüklüğündeki DNA parçalarıdır. RAPD'ın düşük kopya sayısı ve AFLP'nin yüksek maliyeti ile ilgili sıkıntılara çözüm üretmek amacıyla ISSR'ler geliştirilmiştir. Zietkiewicz ve ark. (1994) tarafından açıklanan teknik, PCR reaksiyonundaki primerler gibi mikrosatelit merkezi diziler kullanılarak iç-SSR DNA dizilerinin amplifikasyonu esasına dayanmaktadır. Çoklu lokusa ait yaklaşık olarak 10-60 tane fragment aynı anda oluşturulur, jel elektroforezi ile ayırma işlemi yapılır ve belli büyüklükteki fragmentlerin varlığı veya yokluğu hesaplanır.

RAPD ile maliyeti hemen aynı olan ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) tekniği RAPD'e göre oldukça güvenilir, tekrarlanabilirlik oranı yüksek ve PCR koşullarından çok etkilenmeyen bir tekniktir. Dezavantajları ise primerlerin ayrı ayrı bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi ve benzer büyüklükteki bantların aynı olmama durumudur [15].

1.3.1.3.2.5 SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions-Diziye Dayalı oğaltılmış Bölgeler)

SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions); diziye spesifik oligonükleotid primerleri kullanılarak PCR amplifikasyonu ile tanımlanan, genetiksel olarak belirli bir lokusa ait genomik DNA fragmentleridir. Paran ve Michelmores (1993) tarafından sunulan bu teknik RAPD veya AFLP fragmentlerinin nükleotid dizileri ile ilgilidir. Spesifik primerlerin geliştirilmesiyle diziye özel oğaltılmış bölgelerde tekli RAPD ve AFLP rnlerinin dönüşümünü kapsar [15, 31].

Dominant bir şekilde kalıtılan RAPD'in aksine kodominant kalıtım göstermektedir. SCAR markırının kullanımı basit, ucuz ve reaksiyon koşullarındaki değişikliklere duyarlıdır [15]. SCAR markır tekniği; kısa zamanda ilgili gen ile bağlantılı markır elde etmek, harita tabanlı klonlama yöntemleri için kullanma ve rutin taramalar için uygulanmaktadır [31].

1.3.1.3.2.6 CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequences - Kesilip oğaltılmış Polimorfik Diziler)

PCR rnlerinin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve elektroforezle büyüklüklerine göre ayrılan bu kesilmiş fragmentlerin tespitini içeren bir moleküler markır tipidir. CAPS markır tekniği: PCR temelli markırları geliştirmek için haritalanmış RFLP markırların DNA dizilerini kullanmak için bir yol sağlar. Böylece zor bir süreç olan DNA blotlama yöntemi ortadan kalkmış olur. Bu sebeple CAPS aynı zamanda PCR-RFLP markır olarak da bilinir.

PCR reaksiyonundaki restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesindeki indelleri ve SNP gibi tek baz değişikliğine neden olan restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmlerini ortaya çıkarır. CAPS markırları kodominant ve lokusa spesifiktirler. Homozigot veya heterozigot allellerin ayrımı için kullanılmışlardır. Bundan dolayı bu markırlar; genotipleme, pozisyonel veya harita temelli klonlama ve moleküler tanıma çalışmaları için kullanılmaktadır. Teknik sadece restriksiyon tanıma bölgesinde oluşan mutasyonlarla sınırlandırılmıştır [31].

1.3.1.3.2.7 ESTs (Expressed Sequence Tags - İfade Edilen Dizi İşaretleri / Markırlar)

EST (Expressed Sequence Tags) belirteçleri; temel prensip itibari ile 150-400bp büyüklüğündeki mRNA'ların tamamı ya da belirli bir bölümüne yakın bir kısmına karşılık gelen cDNA klonlarının dizi analiz sonucu oluşturulmuş DNA belirteçleridir. mRNA'lar ve cDNA'lar kullanıldığı için ifade edilmiş (expressed) terimi kullanılmaktadır. Gen bankasında çok sık başvurulan elemanlardır. Etkinliği çok yüksek bir tekniktir. Bu teknik tanımlamanın yanı sıra, haritalama çalışmalarında da kullanılmaktadır.

1.3.1.3.2.8 SNP (Single Nucleotide Polymorphism -Tek Nükleotit Polimorfizmi)

Tek nükleotit polimorfizmleri bir DNA dizisi içinde oluşabilecek küçük bir genetik varyasyondur. SNP'ler transisyonlar (bir pürin bazın (A,G) diğer bir pürin bazına veya bir pirimidin bazın (C,T) diğer pirimidin bazına değişmesi) ve transversiyonlar (bir pürin bazının bir pirimidin bazına değişimi veya tersi) gibi baz değişimlerini içermektedir. SNP'ler en bol bulunan ve canlı organizmalardaki ubiquitin mekanizmalı polimorfizmlerdir, çünkü bireyler arasında tek nükleotitteki farklılıklar neredeyse sınırsız sayıda oluşur. Bu tür markırların gelişmesi yüksek bir genom dizi bilgisi gerektirmektedir [15].

1.3.1.3.2.9 SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism -Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizmi)

SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism): Tek baz çiftindeki farklılıklardan dolayı, tek zincirli DNA'nın farklı katlanmasıyla oluşan polimorfizmleri tanımlamak için kullanılır. SSCP jelinde ayrılan aynı PCR ürünlerinden iki DNA zinciri gibi karmaşık PCR ürünlerini değerlendirmek için etkili bir araçtır. PCR temelli SSCP analizi; basit, hızlı ve çeşitli mutasyonları taramak için hassas bir tekniktir. Genetik özelliklerin allelik varyasyonlarını

çözembilme gibi RFLP tekniğine benzer yönleri vardır. RFLP analizinin aksine, SSCP analizi DNA polimorfizmlerini ve DNA fragmentlerindeki çoklu yerlerdeki mutasyonları tarayabilme özelliğine sahiptir. SSCP markırları; yoğun iş gücü, maliyeti ve otomatik olarak uygulanamaması gibi dezavantajları vardır [31].

1.3.1.3.2.10 SRAP (Sequence Related Amplified Polimorphism-Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm)

SRAP tekniğinin amacı açık okuma çerçevelerini (ORF) çoğaltmaktır. Basitlik, güvenilirlik, seçilen bantların dizileme kolaylığı ve ölçümünün düzenlenmesi gibi özellikler ile bütünleşen bir tekniktir. Bu teknik genomda kodlama yapan bölgeleri hedefler. İndellerin neden olduğu kodominant markırda ki fragment boyutundaki ve nükleotid değişikliklerin neden olduğu dominant markırda ki değişikliklerin SRAP polimorfizmine neden olduğu dizileme sonucuyla gösterilmiştir. SRAP markır sistemi, genetik çeşitlilik çalışmaları, gen etiketleme ve harita oluşturma gibi amaçlar için uyarlanmıştır [31].

1.3.2 ITS (Internal Transcribed Spacers-Transkribe Edilmiş İç Ayırıcılar) ve nrDNA

1.3.2.1 ITS Bölgesi ve Genel Özellikleri

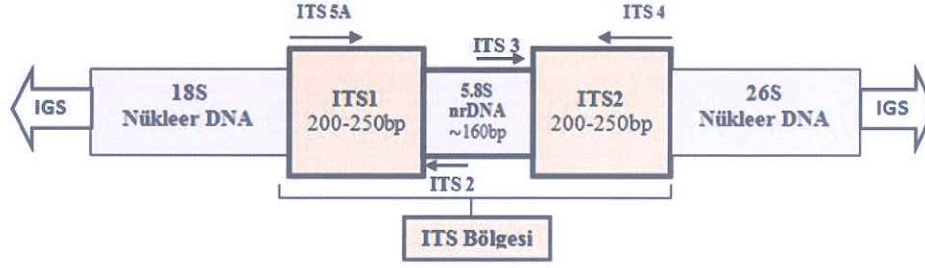
Bitkilerde dizileme temelli moleküler filogenetik çalışmaların büyük çoğunluğu plastid genomundan elde edilen veri setlerine dayalı olarak yapılmaktaydı. İlk olarak Baldwin ve ark. (1995) tarafından yayınlanan eleştiri yazısından sonra ITS dizi temelli filogenetik analizler popüler olmuştur [35].

Bütün organizmaların genomları ribosomal RNA kodlayan DNA dizilerine sahiptirler. Bitkilerde ribosomal DNA (rDNA); nükleer, mitokondri ve kloroplast genomunda bulunur. Genomik DNA üzerindeki rDNA bölgeleri, çoklu gen yapılarından oluşur ve ardışık sıralanmış tekrarlı diziler şeklindedir. Her bir tekrar

birimi, yakın tekrar biriminden IGS (intergenic spacer) bölgesiyle ayrılır. Bitkilerde rDNA'nın tekrar ünitelerinin kopya sayıları oldukça değişkendir. Ribosomal DNA'nın IGS bölgesi diğer bölgeleriyle karşılaştırıldığında oldukça değişken olduğu gözlemlenir. Bu durum onu mikroevrimsel filogenetik karşılaştırmalar için yararlı kılar. rDNA tekrarları; genomik DNA'nın NOR (Nükleolar Organizer Region) bölgelerinde yerleşmiş durumdadır ve 18S küçük alt birim, 5.8S ve 28S büyük alt birim rDNA'ları kodlayan genlerden oluşmaktadır. ITS bölgeleri, genomik DNA üzerindeki bu rDNA tekrarları içinde yerleşmiştir. ITS bölgesinin temel yapısı Şekil 1.1'de gösterilmiştir [36].

nrDNA'nın transkripsiyonel biriminin bir parçası olarak ITS omurgalıları da içeren hemen hemen bütün organizmalarda mevcuttur. Bitki genomunda bir veya birden fazla kromozom bölgesinde rastgele tanımlanan kopyaları 18S-5.8S-26S tekrarları ile karakterize olan geniş bir gen ailesidir. ITS bölgesi üç bileşenden oluşmaktadır: ITS1 ve ITS2 boşlukları ve arada oldukça korunmuş 5.8S rDNA yer almaktadır. Korunmuş 5.8S bölgesinin tahmini fonksiyonel kopya olduğu buna karşın ITS1 ve ITS2 dizilerinin indel birikimi hem de nükleotit yer değiştirmelerinden dolayı daha hızlı değiştiği kabul edilmektedir. Buna ek olarak; ITS2 dizisinin ITS1 dizisinden daha az korunduğu da bilinmektedir [4, 35, 37].

Bitki tür düzeyindeki filogenetik analizlerin büyük çoğunluğu kodlama yapmayan nrDNA'nın ITS bölgesine (ITS1, 5.8S ve ITS2) dayalı olarak yapılmaktadır. Bu bölgeler düşük taksonomik düzeylerde oldukça değişken ve evrensel primerler kullanılarak kolaylıkla çoğaltılabilmektedirler. Bu ITS bölgeleri, rDNA gen bölgelerine bağlanabilen evrensel primerler kullanılarak PCR çalışmalarıyla kolayca elde edilebilir. Bu amaçla kullanılan evrensel ITS (ITS2, ITS3, ITS4 ve ITS5) primerlerinin rDNA üzerindeki bağlanma bölgeleri gösterilmiştir (Bkz. Resim 1.1) [28].



Şekil 1.1: ITS bölgesinin temel yapısı ve evrensel ITS primerlerinin rDNA üzerindeki bağlanma bölgeleri [35]

ITS temelli filogenetik analizlerin niçin popüler olduğuna gelince, bu sorunun cevabı ITS lokusunun filogenetik çalışmalarının amacına uygun birçok avantaja sahip olmasında yatmaktadır. Bu özellikler:

- Biparental kalıtım: Nükleer genoma ait 18S-26S rDNA düzenlemelerinden dolayı, ITS dizileri biparental kalıtım göstermektedirler. Hibrit türlerinin ve poliploid sayılarının ortaya çıkarılmasında bu özellik büyük bir öneme sahiptir.
- Evrensellik: White ve ark. (1990) tarafından çoğu bitkinin ITS dizilerini çoğaltmak için kullanılacak primer setleri tanımlanmıştır. Bu durum sayesinde primer tasarlamaya gerek kalmadan ITS dizisi herhangi nükleer markırdan daha kolay bir şekilde elde edilebilmektedir.
- Basitlik: Nükleer ribosomal genler 18S-5.8S-26S tekrarlarından oluşurlar. Bu tekrarlar haploid genomunun bir veya daha fazla kromozomal lokusunda rastgele bulunur. Bitki genomunda binlerce rDNA tekrarı olduğundan ITS dizisi çoğu düşük kopyalı nükleer lokustan daha kolay bir şekilde izole edilebilmektedir. ITS dizileri angiospermlerde yaklaşık olarak 500-700 bp uzunluğu arasında değişkenlik gösterirler (Bkz. Resim 1.1).
- İntra-genomik aynılık: ITS dizileri, toplu (concerted) evrim olarak adlandırılan bir olaya maruz kalabilirler. Toplu evrim; genomda tekrar kopyaları arasında dizi farklılıkları oluştuğunda meydana gelir.

- İnter-genomik çeşitlilik: ITS dizi varyasyon düzeyleri tür, cins hatta familya düzeyindeki filogenetik çıkarımlar için uygundur.
- Düşük Fonksiyonel Sınırlandırma: ITS'in fonksiyonelliği; küçük alt ünite (SSU), 5.8S ve büyük alt ünite (LSU) ribosomal RNA'ların olgunlaşması sırasında ITS1 ve ITS2 içindeki birincil transkriptin özel olarak uzaklaştırılmasıyla ilişkilidir [35].
- Yüksek Kopya Sayısı: Yüksek kopya sayısı oldukça tekrarlanabilir laboratuvar sonuçlarına izin vermektedir ve moleküler sistematikte geniş çaplı kullanılmasının ana nedenlerinden biridir [37].

ITS bölgesinin birçok avantajının yanında dezavantajları da vardır. Ortak evrim, paralog problemleri, duplikasyonlar veya susturulmuş kopyalar gibi dezavantajlara sahiptir ve bu özellikler hala detaylı olarak analiz edilmemiştir [37]. ITS oldukça hızlı evrimsel orana sahip olmasına rağmen, kısa boyutu ve yüksek düzeydeki homoplasi göstermesi de dezavantajları arasında yer almaktadır [27].

1.3.2.2 ITS Bölgesinin Filogenetik Kullanışlılığı

Bitki tür düzeyindeki filogenetik analizlerin büyük çoğunluğu kodlama yapmayan nrDNA ITS bölgesine (ITS1, 5.8S ve ITS2) dayalı olarak yapılmaktadır. 18S, 5.8S ve 26S nükleer ribosomal genlerin ITS1 ve ITS2 bölgelerindeki dizi varyasyonları filogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [18, 28]. Polimorfik bölgeler rDNA veri setlerinde sıklıkla bulunmuştur. Böyle polimorfizmler filogenetik analizler için polimorfik karakter olarak kodlanmıştır [27]. Böylece nrDNA'nın ITS bölgesi bitki taksonları arasındaki alt düzeydeki filogenetik ilişkilerin çalışılmasında kullanılan temel bir veri kaynağı olma potansiyeli taşımaktadır [4].

nrDNA'nın küçük ve büyük alt birimleri uzak ilişkili cinsler için yeterli bir çözünürlük sağlamak için çok fazla korunmuştur. nrDNA'nın ITS bölgesi aynı cinsle ait türler ve yakın ilişkili cinsler arasındaki ilişkilerin anlaşılmasına son derece büyük katkı sağlamaktadır. Yine de, ITS dizi varyasyonlarının yakın ilişkili türlerin çalışılmasında yeterli olmadığı anlaşılmaktadır. İnterfamilya düzeyinde karşılaştırıldığında, nrDNA cinslerarası düzeyde (intergeneric) düzeydeki filogenetik

çalışmalarda oldukça az kullanılmaktadır. nrDNA ITS bölgeleri yalnızca geniş çaplı olarak bitki filogenetik çalışmalarında interspecific düzeydeki dizi verilerinde kullanılmaktadır. ITS dizi varyasyonları yakın ilişkili türleri ayırmada daima yeterli değildir [6].

Ribosomal genler bireysel, populasyon ve tür düzeyinde ITS dizilerinin benzerliliğine yol açan ortak evrime maruz kalmaktadırlar ve ortak evrim oluşmadığında, ITS bölgesi çoklu ITS kopyaları içeren hibritlerin taranmasını mümkün kılmaktadır [5].

1.3.3 DNA Dizileme

DNA dizi analizleri yada sekanslama, DNA birincil yapılarının tayininde ve nükleotit baz diziliminin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Analizin temel prensibi; bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonudur. Bu hibridizasyon sırasında radyoaktif ya da radyoaktif olmayan maddelerle işaretleme yapılır.

Maxam-Gilbert ve Sanger iki temel dizileme yöntemidir. İlk olarak 1997’de tanımlanan Sanger enzimatik dideoksi tekniği günümüzde dizileme için yaygın olarak kullanılan bir metottur. Maxam ve Gilbert kimyasal parçalama metodu aynı yıl tanımlanan bir başka dizileme metodudur. İki yöntem arasındaki ilk farklılık DNA fragmentlerinin elde edileme sırasında görülmektedir. Her iki yöntemde de DNA molekülleri jel elektroforezinde yüksek bir ayırım gücünde ayrılabilirler. Yalnızca tek bir nükleotidi bile farklı olan DNA fragmentleri kolaylıkla ayırt edilebilir [38-39].

1.3.3.1 Maxam ve Gilbert’in DNA Kimyasal Kırılma (DNA Sequencing) Yöntemi

DNA’nın spesifik kimyasal parçalanmasına bağlı hızlı ve basit bir uygulamadır [39]. Çok yönlü sekans olarak da bilinen bu yöntemde bazı kimyasallarla DNA özgül baz dizilerinden kesilerek değişik uzunlukta fragmentler elde edilir [38]. Ana mantık DNA’daki nükleotitlerin tahrip edilip hasar görmüş

bölgelerden piperidin veya diğer kimyasallarla fosfodiester bağlarının kırılmasıdır. Bu yöntemle bir sekans jelinden kırk klon analizi yapılabilmektedir. Yine de çok fazla tercih edilmeyen bir tekniktir.

1.3.3.2 Sanger Dizileme (Cycle Sequencing) Yöntemi

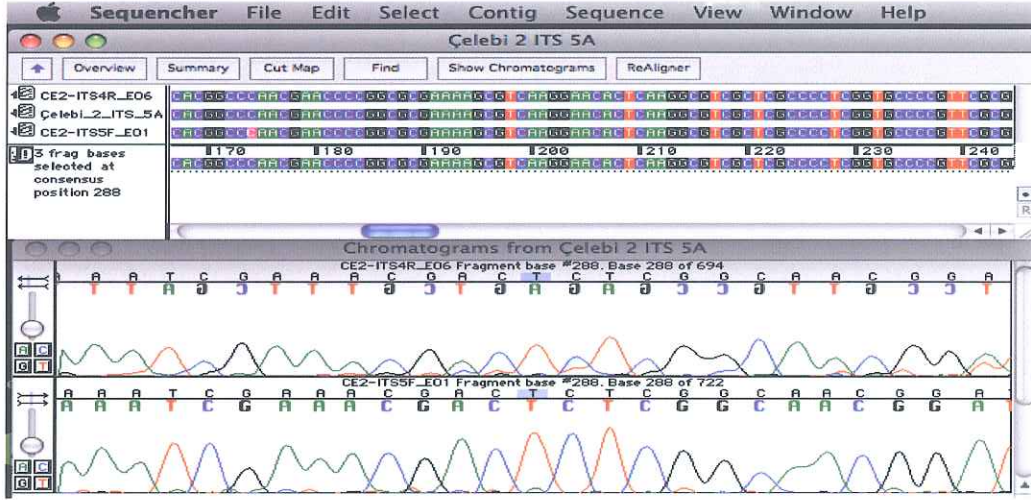
Sanger dizileme (Zincir sonlandırma veya dideoksi metot) dört farklı reaksiyondaki çeşitli uzunluktaki DNA zincirlerinin sentezi için enzimatik bir prosedür kullanmayı gerektirir. Dört bazın (T, C, G ve A) birinde DNA replikasyonu durur ve sonra DNA fragment uzunlukları belirlenir. Fragmentler jelde boyutlarına göre ayrılır. Kısa fragment daha hızlı ayrılır ve jelin aşağısında görünür. Sonrasında jel aşağıdan yukarıya doğru okunur [38].

Sanger dideoksi dizileme tekniğinde (Sanger ve ark. 1997) DNA polimeraz hedef DNA'nın tamamlayıcı kopyasını sentezler. Polimeraz 5' yönünden 3' yönüne doğru uzama gerçekleştirir. Primer veya dideoksi terminatörleri floresan olarak etiketlidirler. Reaksiyon karışımındaki dideoksi nükleotidleri, parçalı fragmentlerin oluşumuna neden olur. Dideoksi nükleotitleri (ddNTP), OH grubu taşımayan modifiye nükleotit substratlarıdır. Bunlar riboz şekerinin ikinci karbon atomuna ek olarak üçüncü karbon atomunda da deoksi halde olduğundan fosfodiester bağının oluşumu engellenir yeni nükleotitler yapıya katılmaz. DNA zincir uzaması sonlanır. Bu Sanger yönteminin en can alıcı noktasıdır [40].

Oluşan ürünlerin ayrıştırılabilmesi için denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi kullanılır. Elektroforez sonunda jel kurutulur ve otoradyografi ile fotoğrafı çekilir. Otoradyogramdan elde edilen en kısası en önde olmak üzere basamak şeklindeki bantlar, radyoaktif izotop taşıyan tek zincirli DNA moleküllerine aittir. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde, tespit edilen parçacıklar reaksiyon karışımına konulan ddNTP'nin tipine göre okunur. Otoradyogramdaki bu bant verilerinden yararlanılarak 5'-3' yönüne doğru olan baz dizilimi saptanmış olur.

1.3.3.3 Otomatik DNA Dizileme Yöntemi (Automated Sequencing)

Maxam-Gilbert ve Sanger yönteminde uygulanan dizileme metodunda ki neredeyse bütün adımlar günümüzde otomatik olarak gerçekleşmektedir [38]. Otomatik DNA Dizi analizinde de Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmıştır. Tek farkı radyoaktif izotop yerine floresan boyaların kullanılmasıdır. Bu sistemde dört farklı renkte boya kullanılır ve sonuçta, dizinin okunmasını sağlayan dört farklı renkteki piklerin oluşturduğu bir model ortaya çıkar. Guanin bazı siyah renkle, Timin bazı kırmızı renkle, Adenin bazı yeşil renkle ve Sitozin bazı mavi renkle Şekil 1.2'de olduğu gibi gösterilir.



Şekil 1.2: Dizi analizi sonucu oluşan piklerin görüntüsü

Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA'nın bulunduğu jel matrisi bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya, ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da

matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir [41].

1.3.3.4 Çoklu Dizi Hizalama ve Clustal W Programı

Çoklu dizi hizalama, üç ya da daha fazla veri setinin (DNA dizisi) dizi hizalamasıdır. Ayrıca çoklu dizi hizalama; dizi oluşturma, moleküler modelleme, veritabanı aramaları ve filogenetik ağaç oluşturulması için tercih edilen biyoinformatiksel bir araçtır. Hizalamanın amacı: dizilerin yeterli benzerlik gösterip göstermediğini belirlemektir [40]. İkili dizi hizalamasından çok daha fazla bilgi verir. Elde edilen çoklu dizi hizalamasından homoloji olduğu çıkarımı yapılabilir ve filogenetik analiz ile dizilerin evrimsel kökenleri değerlendirilebilir. Çoklu dizi hizalaması terimi ayrıca bir dizi kümesinin hizalanması süreci için kullanılır. Üç veya daha çok dizinin elle hizalanması zor olduğu ve genelde çok zaman alıcı olduğu için hizalamaların üretim ve analizi için algoritmalar kullanılır.

Clustal serisi yaygın olarak çoklu hizalama ve filogenetik ağaç hazırlanması için kullanılmaktadır. Clustal serisi içinde en yaygın kullanılan araç CLUSTAL W'dir. Clustal W; orta uzunluktaki veri setlerini çok hızlı ve kullanımı kolay bir şekilde hizalayabilir [42]. Program esasında öncelikle çok yakın ilişkili dizileri ve son olarak da oldukça farklı olanları hizalamaktadır. Clustal W programının kendiliğinden anlaşılabilir bir düzeni ve online yardımı mevcuttur. Bu sebeple bu programın kullanımı zor değildir. Diziler clustal'ın okuyabileceği bir formatta (FASTA) tek bir dosya içinde toplanmış olmalıdır. Varsayılan parametre ayarları kullanılarak diziler hemen hizalanabilir. PAUP gibi kapsamlı ağaç paketleri için veri girişi olarak clustal hizalamaları kullanılır [43].

1.3.4 Filogenetik Analiz

Filogenetik analiz; mevcut olan karakterlerin değişik kriterler kullanılarak analizi sonucu takson ve populasyonlar arasındaki akrabalık ilişkilerini gösteren soy

ağaçlarının oluşturulmasıdır. Gelişimsel biyolojide filogeniler, karşılaştırmalı sistemlerde ve karşılaştırmalı genomik çalışmalarda kapsamlı bilgi kaynağıdır [28]. Günümüzde DNA ve protein dizilerini de içeren moleküler veriler türler arası ilişkileri analiz etmek için kullanılır. Genomlar, mutasyonların birikmesi ile evrimleşirler ve farklı organizmaların genomları arasındaki nükleotid dizisi farkı iki genomun birbirinden ayrılma zamanlamasını yansıtabilir. Farklı genomlardan, genlerden, kodlama yapan ve yapmayan bölgelerden elde edilen diziler filogenetik analiz için kullanılan bir veri kaynağıdır. Bu sayede organizma hatta türlerin mevcut karakterleri karşılaştırılarak aralarındaki evrimsel ilişkileri ortaya çıkarmak mümkündür.

1.3.4.1 Filogenetik Ağaç

Filogenetik incelemelerde türler arasındaki evrimsel ilişkiyi göstermede en uygun yaklaşım elde edilen verilerin çeşitli akış şemaları ve istatistiksel analizlerle filogenetik ağaca dönüştürülmesidir [44]. Filogenetik ağaçlar; evrimsel karakterlerin, hibridizasyonun, polipodin, biyocoğrafyanın, türleşme kökenlerinin, türleşme ve türlerin çeşitliliğinin çalışılmasını sağlarlar.

Bir filogenetik ağaç, dallanma olaylarının modelini ve bazı durumlarda zamanını tanımlar. Türleşme sırasını ve hangi taksonların yakın ya da uzak akraba olduklarını kaydeder. Ağaç, bir düğüm (node) ve dallardan (branch) oluşur. Dallar, türlerin atasal popülasyonlarının zaman içerisindeki durumlarını gösterir. Farklı genomlardan, genlerden, kodlama yapan ve yapmayan bölgelerden elde edilen diziler, tür düzeyi hatta tür içi yaşam ağaçlarının bütün dallarını çözmek için potansiyel olarak uygun veri sunarlar. Dalların yeterince ayrışmaması morfolojik olarak farklı türleri temsil eden büyük cins için bile yaygın bir problemdir. Dalların yeterince ayrışmaması doğrudan yetersiz varyasyona dayandırılır [28]. Düğümler ise; bir türün iki veya daha fazla türev popülasyona ayrıldığı noktaya karşılık gelir. Ağaçta ki öncülü olmayan düğüm köktür. Kök ortak bir atayı temsil eder ve ağacın herhangi bir yerinde yer alabilir. Köksüz ağaçlarda ise; ortak ata gösterilmeden sadece türler arası ilişki ön plana çıkarılır. Filogenetik ağaçta her bir düğüm evrimsel süreçte ayrılan taksonomik bir gruba karşılık gelir. Ağaçta dış dallar taksonları, iç dallar ve düğümler ise taksonlar arası ilişkiyi yansıtır. Birbiri ile yakın ilişkili türler

ağaçta birbirine komşu dallarda yer almaları ile ayırtebilirler. Ağaç dallarının görünümünü topoloji olarak adlandırılır ve dal uzunluğu genellikle dalda oluşmuş değişikliklerin sayısını belirler [45].

1.3.4.1.1 Filogenetik Ağaç Oluşturmada Kullanılan Yöntemler

Filogenetik ilişkileri yeniden oluşturmak için geliştirilen çeşitli metotlar arasında, moleküler sistematik çalışmalarında temel olan dört metot vardır: maksimum parsimoni, neighbour-joining, maksimum likelihood ve bayesian metodudur [26]. Bu metotlarda karakter temelli yöntemler ve mesafe temelli yöntemler olmak üzere iki ana başlık altında gruplandırılmıştır.

1.3.4.1.1.1 Karakter Temelli Yöntemler

En yaygın kullanılan karakter temelli yöntemler: Maximum parsimony (MP), Maximum likelihood (ML) ve Bayes yöntemi'dir. Karakter temelli metotların birbirine bağlı ortak özellikleri azdır. Ayrıca analizdeki bütün adımlarda karakter verilerini kullanırlar. Bu karakterler her bir taksondaki canlıya ait olan moleküler dizilerdir. Bu durum her bir baz pozisyonunun güvenilirliğinin değerlendirilmesine izin verir [40].

1.3.4.1.1.1.1 Maximum Parsimoni (MP), Farklılıkları En Aza İndirme (Tutumluluk) Yöntemi

Hennig'nin filogenetik sistematiginden türevlenen en eski çıkarım metotlarından biridir. Uzaklık metotlarının aksine, bu yöntem doğrudan karakter durumlarını kullanır ve optimalite kriteri temeline dayanır. Bu kriter alternatif ağaçlar arasından en iyisine karar vermek için bir kuraldır. MP analizlerinin aynı skora sahip olan çok sayıda ağaç verme eğilimi vardır. Bu nedenle bu metodun prensibi: çalışmada kullanılan taksonlar arasında gözlenen farklılıkları açıklamak için en küçük sayı değişiklikleri gerektiren ağacı araştırmaktır. Ağaç veya en az

karakter durum değişiklikleri gereken ağaçlar seçilir. Böylece homoplazi en az düzeye indirilir. Eşsiz filogenetik ağaç sayısı da takson sayısının katlanarak artmasıyla paralel olarak artar [26, 40].

MP ile ağaçların oluşturulmasında kesin ve tahmini yaklaşımlar söz konusudur. Kesin yaklaşımda olası tüm ağaçlar gözden geçirilir ve kullanılan optimalite ölçütüne en uygun ağaç belirlenir. Çok zaman alıcıdır ve yirmiden fazla örnekleme varlığında uygun değildir. Çok sayıda dizinin bulunduğu durumlarda tahmini yaklaşım uygulanmaktadır. En tutumlu ağaçların güvenilirlik dereceleri istatistiksel olarak da değerlendirilebilir. Bu probleme yönelik yaklaşımlardan biri bootstrap (seç-bağla testi) olarak adlandırılır. Bu metot 1979'da keşfedilmiş (Efron, 1979) ve Felsenstein (1985) tarafından filogenetik analizlerde ağaç değerlendirme metodu olarak tanımlanmıştır. Bootstrap analizinin sonuçları; kladın monofililiğini destekleyen bootstrap tekrarlarının oranını veren filogenetik ağaçta ki belirli bir dal ile ilişkili olan bir sayı vermektedir. Bootstrap değerlerinin %70'den büyük olması sonucunda doğru filogeni bulunmuştur. Koşulların uygun olmaması durumunda %50'den daha büyük bootstrap değeri de doğru olarak kabul edilebilmektedir. Eğer, belli bir dal için bootstrap desteği %50'nin altında ise; ağacın bu kısmındaki dallanma modelinin belirlenemediği sonucuna varılır ve filogenetik ağaçta bu dal tek düğümden çok çatallı olarak verilir. Bu durum moleküler sistematikte politomi olarak adlandırılır [40].

Köksüz ağaç uzunlukları doğrudan Fitch algoritması kullanılarak hesaplanabilir. Bu metotta ağaç boşlukları (teorik olarak mümkün olabilecek ağaç topolojileri) genellikle cesaretlendirici (heuristic searches) veya dizilerin sayısı az olduğunda (<12) exact searches kullanılarak araştırılır. Kesin (Exact) araştırmaları mümkün olabilecek tüm ağaçları değerlendirirler ve böylece bulunan ağaçların güvenilirliği en üst düzeydedir. Heuristic searches mümkün olabilecek tüm ağaçları değerlendirmez ve bulunan ağaçların güvenilirliği diğeri gibi optimal değildir. MP yöntemi birçok dizi içeren geniş veri setlerinin analizi için yeterince hızlıdır. Dizilerin yakın ilişkili veya takson örneklemesinin yoğun olması durumunda kısa görünen ağaç dalları yeterince güçlüdür. Taksonlar arasındaki evrimsel oranlarda yerdeğiştirme varyasyonları varsa, MP zayıf bir şekilde performans gösterebilir [26].

1.3.4.1.1.1.2 Maksimum Olasılık (Maximum Likelihood-ML) veya En Yüksek İhtimal Yöntemi

Maksimum likelihood, standart istatistik araçlarından biri ve filogenetik analiz çalışmaları için ilk uygulanan bir metottür. Gözlenen veriyi oluşturmada en yüksek olasılığa sahip en iyi ağacı seçmede olasılık modellerini kullanan zor ve karmaşık bir yöntemdir. Moleküler sistematığe göre; bir filogenetik ağacın likelihood'u evrimsel model ve ağaç veren gözlenebilen verinin olabirliğıdir. Bu aynı zamanda bir optimalite metodudur. Bir ağacın likelihood'u hizalanan her bir bölge için likelihood üretmektedir. Ağaç boşlukları genellikle heuristic araştırmalar kullanılarak derinlemesine araştırılır. ML'nin en büyük avantajı; model parametreleri tahmin etme olasılığını içeren karmaşık dizi evrim modelleri kullanarak filogenetik ağaç çıkarımlarına izin vermesidir [26].

1.3.4.1.1.1.3 Bayes Yöntemi

Son olarak geliştirilen bütün filogenetik çıkarım metodlarının en gelişmişidir. Temelde Maximum Likelihood metoduna benzer, ancak sonraki (posterior) olasılık hesapları kullanımı ile bu yöntemden ayrılır. Var olan gözlemlere dayanarak gözlenmeyen bir şey hakkında sonuç çıkarma temeline dayanır. Elde edilmiş olan bir ağaç topolojisindeki mevcut very setinden sonradan elde edilen (posterior) olasılık hesaplamalarıyla destekler ve güvenilirlik aralıkları bulmaya çalışılır. Bu yöntemde ağaç seçiminde, önceki olasılık, analiz öncesinde tüm olası ağaç topolojileri için geçerli olan olasılıktır. Ağacın oluşturulmasından önce her bir topolojinin olasılığı birbirine eşittir [26].

1.3.4.1.1.2 Mesafe Temelli Yöntemler

Mesafe temelli yöntemler ağaç oluşturmak için eşleşmiş iki dizi arasındaki benzersizlik (uzaklık) miktarını kullanırlar. Minimum evrim metodu da kullanılan

yöntemlerden olmasına rağmen çok yaygın değildir. İki dizi arasındaki benzersizliğin doğrudan onların filogenetik ilişkileri ile ilgili olduğu varsayımına dayanan en yaygın kullanılan uzaklık metotları: UPGMA ve NJ'dir. Uzaklık matris metotları basit bir şekilde iki dizi arasındaki farklılıkların sayısını hesaplarlar. Bu sayı evrimsel uzaklık anlamına gelir. Uzaklık temelli metotlar ağacın total dal uzunluğunu azaltmaya çalışırlar. Mevcut diğer tüm metotlar ile karşılaştırıldığında uzaklık metotlarının temel avantajı oldukça hızlı olmalarıdır. Ayrıca diziler arasındaki farklılık düşük olduğunda iyi bir performans gösterirler. Oldukça farklı dizilerden güvenilir uzaklık tahmini elde etmede ki zorluk ve diziler uzaklıklara dönüştüğünde ortaya çıkan bilgi kaybı uzaklık metotlarının dezavantajlarıdır [26, 40].

1.3.4.1.1.2.1 UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means) Metodu

Bir kümeleme veya fenetik algoritmasıdır. Kümeleme metotları orijinal olarak evrimsel ilişkileri tahmin etmekten ziyade benzerlikleri taramak için geliştirilmiştir. Ağaç dallarını çiftler arasındaki en büyük benzerlik ve ortalama kriterlerini temel alarak ekler. Tam anlamıyla evrimsel bir uzaklık metodu değildir. Farklılığın yalnızca moleküler bir saate göre ve işlenmemiş dizi benzersizliklerine yaklaşık olarak eşit olması durumunda, UPGMA metodunun doğru dal uzunlukları ile birlikte doğru bir topoloji oluşturduğu tahmin edilmektedir [26, 40].

1.3.4.1.1.2.2 NJ (Neighbour Joining) Metodu

Genetik uzaklık yöntemi filogenetik ağacı oluşturmak için dizi grubunda her bir çift arasında değişikliklerin sayısını temel alır. Birbirlerine genetik uzaklığı en az olan türler birleştirilerek bir ağaç oluşturulur. Aralarında az sayıda nükleotid değişikliği olan bu dizi çiftleri komşu (neighbours) olarak adlandırılır. Neighbour-joining'de DNA veya amino asit dizileri filogenetik bir ağaç oluşturmak için kullanılan uzaklık matrisine çevrilir [26]. Yaygın olarak kullanılan ve dal uzunluk toplamını azaltarak dizileri kümeleyen NJ metodu oldukça hızlı bir algoritmadır [43]. UPGMA, NJ'den daha hızlıdır. Fakat evrimsel oranlar farklı soy hatlarında eşit

olmadığında uzun dalları kümeleme eğilimindedir. UPGMA kullanarak 10,000 dizi bir dakikadan daha az bir sürede kümelendirken; NJ bu işlemi bir saatinde üstünde bir zaman diliminde gerçekleştirmektedir [42].

1.3.4.1.2 Filogenetik Ağaçların Oluşturulmasında Kullanılan Programlar

PHYLIP ve PAUP; en yaygın kullanılan filogenetik analiz yazılım programıdır. Her ne kadar yaygın olmasa da bir diğer filogenetik ağaç eldesinde kullanılan program MR. BAYES'dir. Ancak bu programların önerdikleri ağaçların bilgisayarda görüntülenmesini sağlayan başka bir program daha vardır. Bu program Treeview programıdır. Her ne kadar programların PC versiyonları mevcut ise de MAC versiyonları daha ileri ve üst sürümdürler.

1.3.4.1.2.1 PAUP* (*:Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods / Parsimoni ve Diğer Metotlar Kullanılarak Yapılan Filogenetik Analiz)

PAUP programı, birçok fonksiyonu (ağaç grafikleri gibi) içine alan filogenetik bir programdır. Parsimoni kullanarak filogenetik analiz anlamına gelir. Lake'nin değişmezler metodunda performans gösterir. PAUP programı, PHYLIP'ten daha iyi olduğundan genellikle muhtemel ağaçları bulur. PAUP'un ağaç düzenlemeleri daha kapsamlıdır ve tekrarlanan dal uzunluklarını birleştirme kriteri sıkıdır. Olabilecek ağaçları araştırma seçeneklerine izin verir. MP ve ML ağaçlarını karşılaştırmak için Kishino-Hasegawa testini kullanır. Çoklu ağaçların konsensus tipini ve MP ağaçları arasındaki farklılıkları adım adım hesaplar [40, 46].

Birbirine uyumlu evrimsel ilişkilere sahip olan bir gruptaki tüm ağaçlar için en geniş taksonlar alt kümesini gösteren uyuşma alt ağaçlarını hesaplar. Henüz oluşturulmamış ağaçların oluşturulup yayınlanması. Yeni ağaçların oluşturulması sırasında benzer sayfalar arasında aynı anda taramaların yapılabilmesine olanak sağlar [46]. Analiz öncesi dizilerin hizalanması gerekmektedir. Hizamla programları FASTA formatındaki dizileri okurlar. Hizalanan dizilerin PAUP programı tarafından

okunması için bazı format değişikliğine ihtiyaç vardır. İnternet tabanlı programlar kullanılarak özel bir formattaki bir dizi istenilen bir formata çevrilebilir.

1.3.4.1.2.2 Mr. Bayes (Bayesian Inference of Phylogeny)

Filogeninin, Bayes Metodu ile tahmini için kullanılan bir programdır. Amaç tek bir doğru filogeniyi bulmak değil, bütün muhtemel filogenilerin sonraki (posterior) olasılık dağılımlarını hesaplamaktır. Geçmiş durumların ve yer oranlarının çıkarımları birleştirici tanılarının hesaplanmasını eş zamanlı ve bağımsız olarak yapar [47].

1.3.4.1.2.3 PHYLIP (The Phylogeny Inference Package)

Filogenetik analizlerin çoğu yönlerini kapsayan yaklaşık olarak otuz programdan oluşan bir pakettir. Pakette kullanılabilen metotlar parsimoni, uzaklık matrisi, çöz-bağla işlevi (bootstrapping) ve ortak karar (consensus) ağaçlarını kapsayan olasılık metotlarını içerir. Ücretsizdir ve çeşitli bilgisayar platformları (Mac, Dos, Unix ve diğerleri) için uygundur. PHYLIP komutlu bir programdır ve ara yüzü basittir[40].

1.4 Çalışmanın Amacı

Anadolu'da yetiştiriciliği yapılan birçok zeytin (*Olea europaea* L.) çeşidi bulunduğu halde bunların morfolojik ve biyolojik özellikleri henüz tam olarak belirlenmiş değildir. Bunlardan çok az bir kısmının özellikleri belirlenmiş olduğu halde, bunların da içlerinde genotipik veya fenotipik nedenlere bağlı varyasyonların olduğu gözlenmektedir. Günümüzde bu tür problemlerin çözümünde moleküler sistematik çalışmalarının önemli katkılar sağladığı bilinmektedir [3].

Taksonların nrDNA ITS bölgeleri; uzun zamandır bitki taksonları arasındaki alt düzeydeki filogenetik ilişkilerin çalışılmasında temel bir veri kaynağı olarak kullanılmaktadır [4]. Bitkilerdeki genetik çeşitliliğinin ortaya konmasında, bitki türleri arasındaki taksonomik ve filogenetik ilişkilerin doğru bir şekilde

belirlenmesinde başarıyla kullanılmaktadırlar. Polimorfizmleri ortaya çıkarma ve kolaylıkla çoğaltılıp dizilenebildiğinden angiospermelerin filogenetik analizinde büyük çapta kullanılmaktadırlar [5]. Nüklear ribosomal DNA'nın filogenetik kullanımı geniş bir taksonomik alan kapsıyor olmasına rağmen; bazen uzak veya yakın ilişkili cinsler arasındaki ilişkileri anlamada oldukça yetersiz kalmaktadır. Bu durumda; bitki filogenetik çalışmaları için kullanılan birkaç evrensel moleküler markıra ilaveten, yeni gen markırları rezolasyonu geliştirmek ve doğru bir bitki filogenetik oluşum için oldukça büyük öneme sahiptirler [6].

Bu çalışmanın amacı, Türkiye'de yetişen ve çoğunlukla yağ ve sofralık zeytin üretiminde kullanılan bazı zeytin çeşitleri (*Olea europaea* L. cv. Gemlik ve *Olea europaea* L. cv. Çelebi) arasındaki filogenetik ilişkileri anlamak, genomik DNA bölgelerindeki nükleotid varyasyonlarını değerlendirmek, tür içindeki filogenetik ilişkileri aydınlatmak, birkaç potansiyel polimorfik bölge analiz edilerek zeytin çeşitleri arasındaki çeşitliliği belirlemek ve daha sonra gerçekleştirilebilecek çalışmalara sağlam bir zemin oluşturmaktır.

Bu çalışmada, iki zeytin çeşidi olan Çelebi ve Gemlik'e ait 16 örneğin total genomik DNA'sı fenol-kloroform-izoamilalkol protokolüne göre izole edildi. 16 zeytin örneğine ait nrDNA ITS bölgesi çoğaltıldı ve dizilendi. Bu dizilerin filogenetik analizi yapıldı. Oluşan ağacın dallanma modeli tam olarak belirlenemedi. Filogenetik ağaçta dallar tek düğümünden çok çatallı olarak görüldü. Bu durum da politomi durumunu çözmek için yeni markır denendi. DK31 olarak adlandırılan bu markır; zeytin kasım ayı meyvesiz yapraklardan (NNF) elde edilen cDNA kütüphanesinde tanımlanan ve biyoinformatik araçlar yardımıyla daha fazla bilgi elde edilen cDNA'nın soğuk stresini indükleyen protein / dehidrin genine benzediği doğrulanmıştır. Fakat belirli bir dokuya ve gelişimsel duruma özgü olan geni tanımlamak için herhangi bir karakterizasyon yapılmamıştır. Ve literatürde de herhangi bir kaynak yoktur. Ancak Dündar ve ark. tarafından yapılan çalışmada aynı genetik benzerliklere sahip iki zeytin ağacının genetik benzerliklerini belirlemek için markır olarak kullanılmıştır [48]. Bizim çalışmamız da zeytin çeşitlerini ayırmak için yeterli polimorfizm oluşturdu ve politomi problemi çözüme kavuşturuldu.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Bitki Örnekleri

Çalışmada kullanılan bitki materyalleri Doç. Dr. Sevcan ÇELENK tarafından toplanmıştır. Arazi çalışması yapıldıktan sonra elde edilen taze zeytin yapraklarının uzun süre saklanması için silika jel içerisine alınmış ve bu şekilde bize ulaştırılmıştır.

Bursa ve çevresinde en yaygın kültür olan Gemlik ve Çelebi zeytin çeşitlerine ait yaprak örnekleri iki farklı bölgeden alınarak numaralandırılması yapılmıştır. Numaralandırma sonucunda Gemlik çeşidine ait 5 örnek, Çelebi çeşidine ait 6 örnek ve Ayva köyüne gidişte alınan Ayva-Gemlik'e ait 5 örnek olmak üzere toplamda 16 adet zeytin örneği çalışmada kullanılmıştır. Arazi çalışması yapılan bölgelere ait lokalite bilgileri bulgular kısmında sunulmuştur.

2.1.2 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan pipet uçları, endorf tüpleri, PCR tüpleri, çözeltiler, cam malzemeler ve ısıya dayanıklı diğer malzemeler çalışmaya başlamadan önce 121°C de 20 dakika süreyle 1 atmosfer basınçta otoklavlanarak sterilize edildi.

2.1.3 Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar Merck ve Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallardan Tris, üre, izopropil alkol ve EDTA Amresco'dan; borik asit, fenol-kloroform ve etanol Merck'ten temin edilmiştir. Yine DNA izolasyonunda kullanılan RNaz A ise Sigma Aldrich'ten alınmıştır. PCR reaksiyonlarında kullanılan dNTP mix, 10X tampon, Taq DNA polimeraz ve MgCl₂ kimyasalları ile Fermantas firmasından alınmıştır. Jel elektroforezinde kullanılan Agaroz Biomax'tan, etidyum bromid Appllichem'den,

yükleme boyası ve DNA büyüklüklerini belirleyici DNA merdiveni de Fermentas firmalarından yerli kuruluşlar aracılığıyla temin edilmiştir.

2.1.3.1 Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar

2.1.3.1.1 Fenol-Kloroform-İzoamilalkol Metoduyla Yapılan DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan bitki materyallerinin genomik DNA'sı (gDNA) Dellaporta ve arkadaşları [49] tarafından geliştirilen ve modifiye edilen yöntemle izole edilmiştir. İzolasyon için kullanılan tüm kimyasallar Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo2.1: Genomik DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar ve Konsantrasyonları

Kimyasal Adı	Konsantrasyon
Ekstraksiyon tamponu (1 L)	33.6 gr. Üre 0.5 M EDTA (pH 8) 1 M Tris-HCl (pH 8) 5 M NaCl %10 SDS
Fenol / Kloroform / İzoamil alkol	25 : 24 : 1
NaAc	3 M (pH 5.2)
İzopropil alkol	%100
TE	10 mM
RNaz A	10 mg / mL
EtOH	%70 ve %100 lük

2.1.3.2 PCR'de Kullanılan Kimyasallar

PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler ticari olarak elde edildi. Primerler -20°C buzdolabından çıkarıldıktan sonra yaklaşık 15 sn 12.000 rpm'de santrifüj yapılarak kuru çökeltinin tüpün dibinde toplanması sağlandı ve 1 ml TE içerisinde çözülerek ana stok hazırlandı. 1 mL TE içinde sulandırılmış primerlerden 250 µL'lik 5 µM'lık çalışma solusyonları Tablo 2.2'de gösterilen konsantrasyon hesaplamalarına göre hazırlandı. Çalışmada kullanılan primerlerin DNA dizileri, erime sıcaklıkları (T_m) Tablo 2.2'de gösterilmiştir. PCR reaksiyonunda kullanılan diğer bileşenler Tablo 2.3'de listelenmiştir.

Tablo 2.2: PCR'da kullanılan primerler, konsantrasyonları ve T_m değerleri*

Primer	Molaritesi	Çalışma Solusyonu	Nükleotit Dizileri (5' - 3')	T _m
ITS5A	5 µM	7.7 µL primer + 242.3 µL su	TCCTCCGCTTATTGATATGC	49,9°C
ITS4	5 µM	6.4 µL primer + 243.6 µL su	CCTTATCATTTAGAGGAAGGAG	52,1°C
DK31ampR	5 µM	47.89 µL primer + 202.11 µL su	GTTCAAGGAATCATATTATATA	52,1°C
DK31ampL	5 µM	40.45 µL primer + 209.55 µL su	TGTTGCATTCAGTTTCTAGTGA	53,5°C

*: Ekler kısmında referansları sunulmuştur.

Tablo 2.3: PCR’da kullanılan bileşenler, miktarları ve konsantrasyonları

Kimyasal Adı	Miktarı	Konsantrasyon
dH ₂ O	10.8 µl	-
Tampon	2.5 µl	10 X
DMSO	2.5 µl	-
ITS4	2.5 µl	pmol / ml
ITS5A	2.5 µl	pmol / ml
MgCl ₂	2.5 µl	25 mM
dNTP	0.4 µl	10 mM
Taq DNA Polimeraz	0.3 µl	5 ünite
gDNA	2 µl	-
Toplam	25 µl	

Kimyasal Adı	Miktarı	Konsantrasyon
dH ₂ O	10.5 µl	-
One Taq Quick-Load 2X Master Mix Standart Buffer	12.5 µl	1X
DK31 ampR	0.5 µl	pmol / ml
DK31 ampL	0.5 µl	pmol / ml
gDNA	1 µl	-
Toplam	25 µl	

2.1.3.3 Agaroz Jel Elektroforez Tamponları

Agaroz jel elektroforezinde 0.5X’lik TBE kullanılır. Bunun için ise hazırlanan 5X TBE seyreltilir. 5X TBE’nin hazırlanışı ve kullanılan kimyasallar Tablo 2.4’deki gibidir.

Tablo 2.4: 5X TBE tamponu hazırlama

Tris - Base	54 g
Borik Asit	27.5 g
0.5 M EDTA	20 ml
Saf su	1 L’ye tamamlanır

2.2 Yöntem

2.2.1 Zeytin Total Genomik DNA İzolasyonu

Bu çalışmada kullanılan bitki materyallerinin genomik DNA'sı (gDNA) Dellaporta ve arkadaşları [49] tarafından geliştirilen ve modifiye edilen yöntemle izole edilmiştir. Zeytin total genomik DNA izolasyonunda kullanılan yöntemin bütün basamakları ayrıntılarıyla aşağıda verilmiştir.

2.2.1.1 Fenol-Kloroform-İzoamilalkol Protokolü

Silika jel içerisindeki taze zeytin yapraklarından yaklaşık 100 mg tartılarak havana alındı. Yapraklar izolasyondan önce havanda sıvı azot kullanılarak iyice ezildi. Sıcaklık 0 °C'nin aşağısında tutularak oksidasyon enzimlerinin bu adım sırasında inaktif olması sağlandı [50]. Toz haline getirilen bitkiler eppendorf tüplerine alındı. 600 µL ekstraksiyon (izolasyon) tamponu eklenerek çözüldü ve vorteks yapıldı. Üzerine 500 µL fenol-kloroform-izoamilalkol eklendi ve 5 dk alt-üst edildi. 12000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Böylece proteinler dibe çöktü ve DNA üst kısımda kaldı. Oluşan süpernatant (500 µL) temiz bir tüpe aktarıldı. Üstteki süpernatant hacminin %10'u kadar (50 µL) 3M Sodyum Asetat (NaAc: ph 5.2) eklendi ve alt-üst edildi. Süpernatant hacmi kadar (500 µL) izopropanol eklendikten sonra DNA çıplak gözle görüldü. DNA iplikleri görülmezse bile izolasyon basamağına kaldığı yerden devam edilmelidir. Bu adımdan sonra tüp kuvvetli bir şekilde çalkalanmamalıdır. Çünkü DNA bu adımdan itibaren parçalanmaya çok elverişlidir [50]. Daha sonra 2 dk 12000 rpm'de santrifüj yapılarak DNA çöktürüldü. Dipte pellet oluştu ve üstteki çözelti atık şişeye boşaltıldı. Oluşan pellete 500 µL TE (10 mM, ph 8) eklendi ve pellet pipetaj yapılarak çözüldü. 5 µL RNaz A (10 mg/ml) eklendi ve pipetaj yapılarak yağsı tabaka homojen hale getirildi. 30 dk 37°C'de inkübasyona bırakılarak RNA uzaklaştırıldı. 50 µL NaAc (3M) eklendi ve alt-üst edildi. 1 mL %90'luk ETOH eklenip alt-üst edildi ve -80°C'de 10 dk bekletildi. Daha sonra 10 dk 13000 rpm'de santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlandı. Üstteki süpernatant çöpe atıldı ve altta pellet kaldı. Kalan çökelti ise %70'lik ETOH ile

pipetaj yapılarak yıkandı. 2 dk 12000 rpm'de santrifüj yapıldı. Oluşan çökeltiden etanol uzaklaştırıldı. Ependorf tüpleri kağıt havlu üzerine yan yatırıldı ve etanol kalıntılarının uçması sağlandı. Bu aşamada pellet aşırı bir şekilde kurutulmamalı, eğer kurutulursa çözme işlemi zorlaşabilir [50]. Oluşan gDNA çökeltisi, 50 µL TE veya 200 µL saf su eklenerek pellet kayboluncaya kadar çözüldü ve zeytin gDNA'sı izole edilmiş oldu.

2.2.2 DNA'nın Saflığının Belirlenmesi

İzolasyondan sonra DNA konsantrasyonunu ve parlaklığını belirlemek için %0.8'lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. UV ışığı altında bantlar gözlemlendi ve jel görüntüleme cihazının bilgisayar programı ve fotoğraf makinesi yardımıyla fotoğrafları çekilip veriler kaydedildi. Bu görüntü PCR reaksiyonunda kalıp DNA'nın miktarının belirlenmesinde referans alınmıştır.

2.2.3 PCR Reaksiyonlarının Yapılışı

İzole edilmiş gDNA'ların ITS bölgelerinin çoğaltılmasında, ITS5A ve ITS4 primerleri kullanıldı. Bu primerler yardımıyla, rDNA gen tekrarları arasında kalan ITS1, 5.8S ve ITS2 bölgeleri PCR yoluyla çoğaltıldı. DNA üzerinden bu bölgelerin çoğaltılması 200 µl'lik ependorf tüplerinde; 10X'lik reaksiyon tamponundan 2.5 µl, 25 mM MgCl₂'den 2.5 µl, 10mM dNTP'den 0.4 µl, 50 pmol/µl'lik primerlerden 2.5 µl, Taq DNA Polimeraz'dan 0.3 µl, DMSO'dan 2.5 µl, kalıp DNA'dan 2 µl, dH₂O'dan 10.8 µl alınarak 25 µl son hacmine tamamlandı. Çalışmada kullanılan DK31 primeri için PCR reaksiyonu 2X OneTaq quick-Load® Master Mix (BioLabs) kullanılarak yapıldı. PCR bileşenleri firma tarafından sağlanan protokole uygun miktarlarda eklendi. 200 µl'lik ependorf tüplerinde; 2X'lik Master Mix'den 12.5 µl, 50 pmol/µl'lik primerlerden 0.5 µl, kalıp DNA'dan 1 µl, dH₂O'dan 10.5 µl alınarak 25 µl son hacmine tamamlandı. Negatif kontrol (kalıp DNA olmayan) kontaminasyon olasılığını gözlemlmek için her bir amplifikasyonda yer aldı.

Çalışmalarda kullanılan PCR programı Tablo 2.5’de sunulmuştur. DK31 primeri için döngü parametreleri Mix protokolüne uygun olarak ayarlandı. Ayrıca protokoldeki bazı basamaklarda değişiklik yapıldı. Döngü parametreleri: başlangıç denatürasyon adımı 95 °C’de 5 dakika, annealing sıcaklığı 50-53°C arasında 45 saniye, uzama basamağı hedef genin her kb karşılık 1 dakika olacak şekilde 72°C’de 2 dakika olarak ayarlandı. Bu döngü 35 kez tekrarlandı. Bu döngü adımlarını final uzama zamanı izledi. 72°C ‘de 10 dakika final uzama zamanı ayarlandı. Sonra reaksiyon 4 °C’ye düştü. Çalışma boyunca Çeşitli PCR cihazları (Bioer / GenePro, Techne-Tc-5000) kullanıldı.

Tablo 2.5: PCR döngü koşulları

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94°C	5dk	1 Döngü
Denatürasyon	94°C	45sn	35 Döngü
Primer Bağlanma	50-53°C	45sn	
Uzatma	72°C	2dk	
Son Uzatma	72°C	10dk	1 Döngü
Son sıcaklık	4 °C	25sa	

2.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonucunda oluşan bantların gözlenmesi için %0.8’lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bunun için 0.8 g agaroz tartıldı ve 100 mL 0.5X TBE tamponu içinde, mikrodalga fırında kaynatılarak çözüldü. Karışım 50°C’ye soğutulmuş içine 1 µL EtBr ilave edildi. Tampon, tarakları önceden yerleştirilmiş jel kasetine döküldü ve polimerleşmesi için 15-20 dk beklendi. Jel polimerleştikten sonra kasetten taraklar çekilerek çıkartıldı. Hazırlanan jel, elektroferez tankına yerleştirilip üzeri kaplanıncaya kadar 0.5X TBE tamponu ile dolduruldu.

5 µl PCR ürünü, 1 µl yükleme boyası (6X DNA loading dye) ile karıştırıldı ve kuyucuklara pipet yardımıyla yüklendi. PCR ürününün büyüklüğünü belirleyebilmek amacıyla 6 µl DNA büyüklük belirleyici (1 kb DNA ladder) boş bir kuyucuğa yüklendi. Örnekler 100 voltta 40 dk yürütüldü. Daha sonra kullanılan jel, jel görüntüleme cihazına alındı. UV ışığı altında bantlar gözlemlendi ve jel

görüntüleme cihazının bilgisayar programı ve fotoğraf makinesi yardımıyla fotoğrafları çekilip veriler kaydedildi.

2.2.5 Dizileme ve Dizi Analizi

Çoğaltılan ITS ve DK31 bölgesinin DNA dizilerini elde etmek için, PCR ürünleri dizileme amacıyla RefGen (Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji, Ankara) şirketine gönderildi. ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Fostercity, CA) kullanılarak BigDye Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Fostercity, CA) yardımıyla dizileme gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi için ücretli profesyonel bir bilgisayar programı olan Sequencher 4.10.1 kullanıldı . Bu programda kontiglerin (contig) durumlarına bakılarak DNA dizileri görsel olarak işlendi ve ortak karar (konsensus) dizileri oluşturuldu. Oluşturulan konsensus dizileri (FASTA formatında) Word'e kopyalandı ve dizi hizalaması için kullanıma hazır hale getirildi. Sonraki adım dizileri hizalamaktır. Taksonlar birbirlerinden farklı olduğu için, uzun mutasyonlar (indel) birikir ve taksonların benzerliklerini arttırmak için dizilerin içine boşluklar eklenmesine gerek vardır [26]. Dizi hizalaması için internet üzerinden ücretsiz olarak kullanılabilen ClustalW programı kullanıldı. Word'e kopyalanan diziler ClustalW programına yapıştırıldı ve varsayılan komutlar kullanılarak dizi hizalaması gerçekleştirildi.

2.2.6 Filogenetik Analiz

Dizileri elde edilmiş olan zeytin çeşitleri arasındaki akrabalık derecelerini öğrenebilmek için yaygın olarak kullanılan PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods) 4.0b10 filogenetik analiz yazılımının uygun parametreleri kullanılarak analiz yapıldı. Bu parametrelerden karakter temelli metotlar kullanılırken en iyi uygunluk kriteri (Optimality criterion) olarak parsimoni kriteri seçilip, arama algoritması (Search algorithm) olarak Exhaustive araştırma stratejisi seçeneği kullanılmadığı ve Branch-and-Bound seçeneği de çok çok uzun sürdüğü için, Heuristic araştırma stratejisi ve Bootstrap seçildi. Mesafe temelli yöntemlerden ise UPGMA ve NJ metotları seçilerek fenetik analizleri yapıldı.

3. BULGULAR

3.1 Bitki Materyallerinin Toplanması

Araştırmanın başlaması için öncelikle örnek alınacak bölgeye ve ağaçlara karar verilmesi gerekmektedir. Örnek alınacak alanlara karar verilmesi amacı ile biri Uluabat göl kenarı diğeri de İznik göl kenarı olmak üzere iki ayrı bölgeye 15 Mart 2012 ve 29 Mart 2012 tarihlerinde Doç. Dr. Sevcan ÇELENK ve ekibi tarafından iki kez arazi çalışması yapılmıştır. Arazi çalışması yapılan bölgelere ait bilgiler şu şekildedir:

- Uluabat Gölü civarında belirlenen lokalite:

Fadıllı Köyü çıkışı, Ayva Köyüne 2 km, Fadıllı Köyünden Ayva Köyüne gidişte Köprü yanı

Koordinat: 40 20' 16 K, 28 40' 29 D, 143 m

- İznik Gölü civarında belirlenen lokalite:

Paşapınar Köyü 500 m

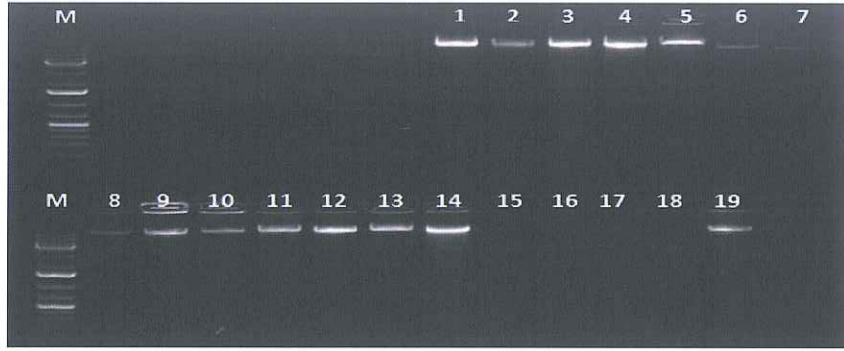
Derbent Köyü Meralığı, Bursa İznik Arası 500. km, Aydınlar Köyü-Bursa arası 600-800.m ler arası.

Koordinat: 40 23' 29 K, 29 27' 27 D, 127 m

Arazi çalışması sırasında Çelebi ve Gemlik çeşitlerine ait örnekler incelenmiş, morfolojik olarak ağaç gövdeleri ve yapraklarında görülen farklılıklar ve ayrırcı karakterler belirlenmiştir. Bu farklılıklara dayalı olarak belirli zeytin ağaçlarından örnekler toplanarak uzun süre saklanması için silika jel içerisine alınmıştır. Bursa ve çevresinde en yaygın kültür olan Gemlik ve Çelebi zeytin çeşitlerine ait yaprak örnekleri iki farklı bölgeden alınarak numaralandırılması yapılmıştır. Toplamda 16 adet zeytin örneği iki çeşitten toplanmıştır.

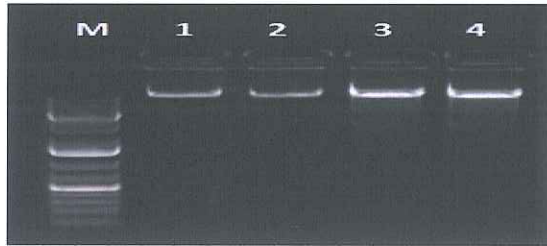
3.2 DNA İzolasyonu

Bu çalışmada kullanılan bitki materyallerinin genomik DNA'sı (gDNA) Dellaporta ve arkadaşları [49] tarafından geliştirilen ve modifiye edilen yöntemle izole edildi. Bu yöntemle izole edilen zeytin çeşitlerine ait gDNA'ların agaroz jel görüntüsü Şekil 3.1'de gösterilmiştir. Bazı zeytin çeşitlerinde istenilen kalitede saflık ve parlaklık elde edilemediğinden tekrar izolasyon yapıldı. Tekrar izolasyonu yapılan zeytin çeşitlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 : Zeytin çeşitlerine ait gDNA'ların agaroz jel görüntüsü

M: Markır, 1: Çelebi 1 , 2: Çelebi 2 , 3: Çelebi 3 , 4: Çelebi 4 , 5: Çelebi 5 , 9: Çelebi 6, 10: Gemlik 1 , 11: Gemlik 2 , 12: Gemlik 3 , 13: Gemlik 4 , 14: Gemlik 5 , 19: Ayva-Gemlik 5

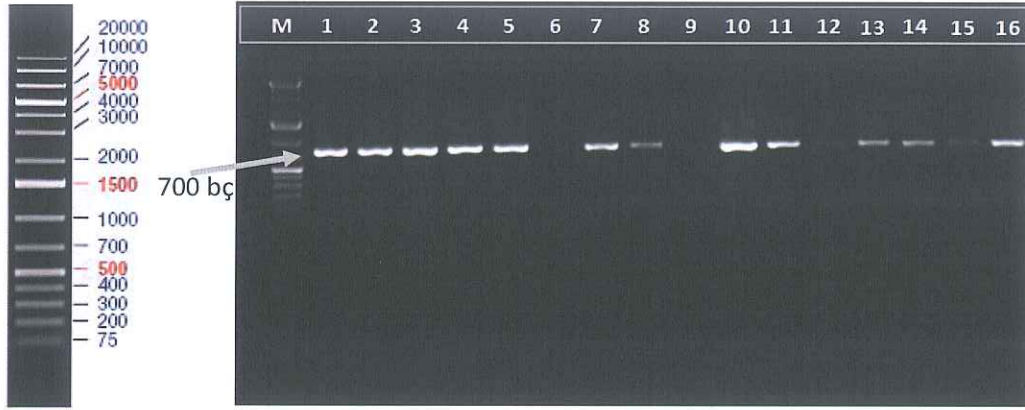


Şekil 3.2: Zeytin çeşitlerine ait gDNA'ların agaroz jel görüntüsü

1: Ayva-Gemlik 1, 2: Ayva-Gemlik 2, 3: Ayva-Gemlik 3, 4: Ayva-Gemlik 4

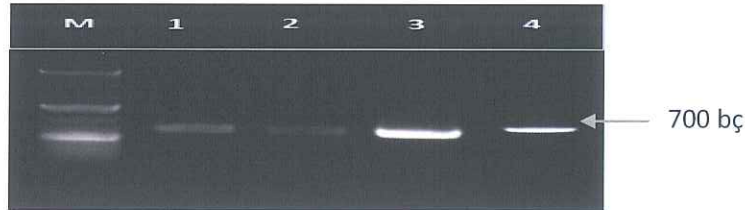
3.3 PCR Reaksiyonları

Zeytin çeşitlerine ait ITS ve DK31 bölgesi PCR reaksiyonu ile çoğaltıldı. Her iki bölgenin amplifikasyonu sonucu yaklaşık 750 bp uzunluğunda tek bir spesifik bant elde edildi. ITS ve DK31 bölgesine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 3.3- 3.4-3.5-3.6'daki gibidir. Şekil 3.6'da gösterilen DK31 PCR jel fotosu, farklı jellerin sonuçlarının resimde (bilgisayarda) birleştirilmesiyle elde edilmiştir.



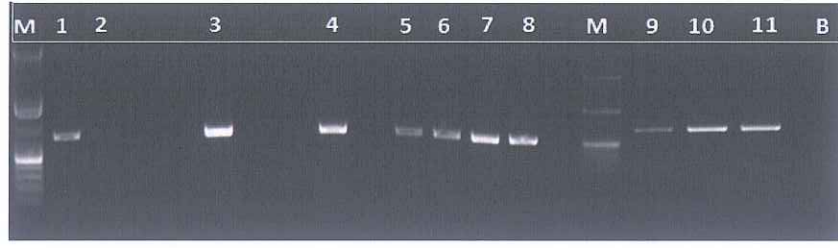
Şekil 3.3: DNA moleküler ağırlık markırı ve ITS bölgesine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

M: Markır, 1: Çelebi 1, 2: Çelebi 2, 3: Çelebi 3, 4: Çelebi 4, 5: Çelebi 5, 7: Gemlik 1, 8: Gemlik 2, 10: Gemlik 4, 11: Gemlik 5, 13: Ayva-Gemlik 2, 14: Ayva-Gemlik 3, 16: Ayva-Gemlik 5



Şekil 3.4: ITS bölgesine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

M: Markır, 1: Çelebi 6, 2: Gemlik 3, 3: Ayva-Gemlik 1, 4: Ayva-Gemlik 4



Şekil 3.5: DK31 bölgesine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

M: Markır, 1: Çelebi 1, 2: Çelebi 2, 3: Çelebi 5, 4: Gemlik 2, 5: Gemlik 4, 6: Gemlik 5, 7: Ayva-Gemlik 1, 8: Ayva-Gemlik 2, M: Markır, 9: Ayva-Gemlik 3, 10: Ayva-Gemlik 4, 11: Ayva-Gemlik 5, B: Blank



Şekil 3.6: DK31 bölgesine ait PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü

M: Markır, 1: Çelebi 3, 2: Çelebi 4, 3: Çelebi 6, 4: Gemlik 1, 5: Gemlik 3

3.4 DNA Dizileme ve Dizi Analizi

3.4.1 Dizileme Reaksiyonları

Çoğaltılan ITS ve DK31 bölgesinin DNA dizilerini elde etmek için, PCR ürünleri saflaştırma ve dizileme amacıyla RefGen (Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji, Ankara) şirketine gönderildi. Otomatik DNA dizileyicisi üniversitemizde olmadığı için REFGEN firmasından hizmet alımı yapıldı. Gerçekleştirilen dizileme reaksiyonlarının sonuçları *ABI prism* formatında ulaştırıldı.

3.5 Ham Verilerin Filogenetik Analize Hazırlanması

Ham verilerin filogenetik analize hazırlanması; *ABI prism* formatında bize ulaşan zeytin çeşitlerine ait dizilerin işlenmesini, dizilerin hizalanmasını ve hizalanan dizilerin PAUP programı tarafından okunması için internet tabanlı programlar kullanılarak bazı format değişikliği yapılmasını kapsayan birkaç basamağı içerir.

3.5.1 Dizilerin İşlenmesi

ABI prism formatında gelen DNA dizilerin işlenmesi için Sequencher 4.10.1 programı kullanıldı. Her bir zeytin çeşidinin ITS ve DK31 bölgesine ait ileri (forward) ve geri (reverse) dizilerinden kontig oluşturuldu. Dizileme reaksiyonlarını gerçekleştiren cihazın yanlış okumuş olduğu bazı bazlar veya arka plan kirlilikleri, kromatogramdaki sinyallerin güçlülüğüne (piklerin/grafik tepesinin yüksekliğine), dizilerin temizliğine bakılarak Sequencher 4.10.1 programında el ile görsel olarak düzeltildi ve kontig dizileri elde edildi. Böylelikle çalışılan zeytin çeşitlerinin ITS ve DK31 bölgelerine ait ileri (forward) DNA dizileri elde edildi.

3.5.2 Dizilerin Hizalanması

Dizilerin hizalanması için ClustalW programı kullanıldı. Bu program Fasta formatında çalıştığından, elde edilen DNA dizileri Microsoft Office Word programı yardımıyla Fasta formatına çevrildi ve hizalamaya hazır hale getirildi. DNA baz sıraları ClustalW programında varsayılan komutlar kullanılarak hizalandı ve çeşitler arasındaki baz farklılıkları tespit edildi. 16 zeytin örneğine ait elde edilen DNA dizilerinin hizalanması sonucunda oluşan baz farklılıkları EK B ve EK C'de sunulmuştur.

3.6 Filogenetik Analiz

Filogenetik analiz için PAUP 4.0b10 programı kullanıldı. Bu program #Nexus formatında çalışmaktadır. ClustalW programında hizalanmış olan diziler

#Nexus formatına çevrilerek PAUP 4.0b10 programı için filogenetik analize hazır hale getirildi. PAUP programı açıldıktan sonra yapılması istenen analizler ve kriterler seçilerek kolaylıkla filogenetik ağaçlar oluşturuldu.

Kriterlerden karakter temelli yöntemlerden olan Parsimoni seçilip Heuristic araştırma yapıldı ve oluşan ağaçlar kaydedildi. Oluşan ağaçların ortak uyumluluk (konsensus) ağaçları pencereden gerekli yollar izlenerek oluşturuldu ve kaydedildi. Yine Parsimoni kriteri kullanılarak Bootstrap analizi yapıldı ve uyumluluk ağacı kaydedildi. Daha sonra mesafe temelli yöntemler kullanılarak UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Means) ve NJ (Neighbor Joining) analizleri yapıldı. Oluşturulan filogenetik ağaçlar ve yorumlar sonuç bölümünde sunulmuştur.

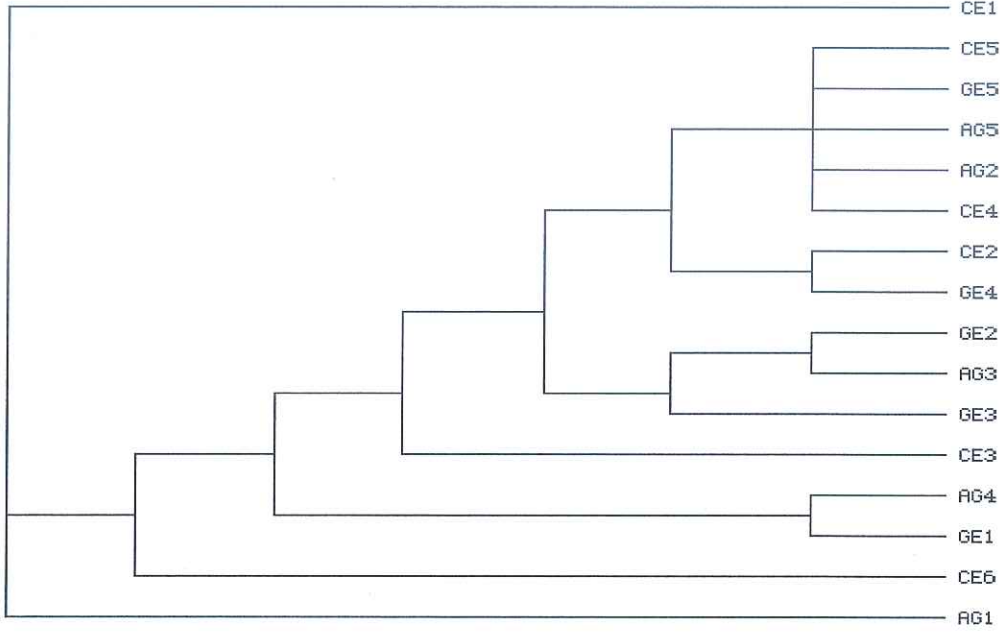
4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bitki tür düzeyindeki filogenetik analizlerin büyük çoğunluğu kodlama yapmayan nrDNA ITS bölgesine (ITS1, 5.8S ve ITS2) dayalı olarak yapılmaktadır. 18S, 5.8S ve 26S nüklear ribosomal genlerin ITS1 ve ITS2 bölgelerindeki dizi varyasyonları filogenetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [18, 28]. Polimorfik bölgeler rDNA veri setlerinde sıklıkla bulunmuştur. Böyle polimorfizmler filogenetik analizler için polimorfik karakter olarak kodlanmıştır [27]. Böylece nrDNA'nın ITS bölgesi bitki taksonları arasındaki alt düzeydeki filogenetik ilişkilerin çalışılmasında kullanılan temel bir veri kaynağı olma potansiyeli taşımaktadır [4]. Nüklear ribosomal DNA'nın filogenetik kullanımı geniş bir taksonomik alan kapsıyor olmasına rağmen; bazen uzak veya yakın ilişkili cinsler arasındaki ilişkileri anlamada oldukça yetersiz kalmaktadır. Bu durumda; bitki filogenetik çalışmaları için kullanılan birkaç evrensel moleküler markıra ilaveten, yeni gen markırları rezolasyonu geliştirmek ve doğru bir bitki filogenetik oluşum için oldukça büyük öneme sahiptirler [6].

Bursa ve çevresinde yayılış gösteren Gemlik ve Çelebi zeytin çeşitlerine ait 16 örneğin akrabalık ilişkilerini ortaya koymak amacıyla nrDNA ITS bölgesi ve soğuk stresini indükleyen protein / dehidrin genine benzediği varsayılan DK31 bölgesi çalışıldı. Yöntemler kısmında bahsedilen uygulamalar yapılarak çeşitler arasındaki genetik benzerlikler ve farklılıklar ortaya kondu. Çalışılan çeşitlerinin ITS nrDNA bölgesi ile DK31 bölgesine ait toplam baz uzunluğu 641-746 baz çifti arasında değişim gösterdiği gözlemlendi. Mevcut olan karakterlerin değişik kriterler kullanılarak yapılan analizi (PAUP 4.0b10 programında) sonucu zeytin çeşitleri arasındaki akrabalık ilişkilerini gösteren soy ağaçları oluşturuldu.

ITS bölgesine ait diziler kullanılarak yapılan parsimoni analizinde toplam 772 karakter incelenmiş ve bunlardan 601 karakter sabit(constant) karakterli, 166 karakter değişken karakterli, parsimonik bilgi içeren karakter sayısı ise 5 çıkmıştır. Heuristic arama sonucunda toplam 1 372 860 farklı ağaç topolojisi oluşturulmuş ve

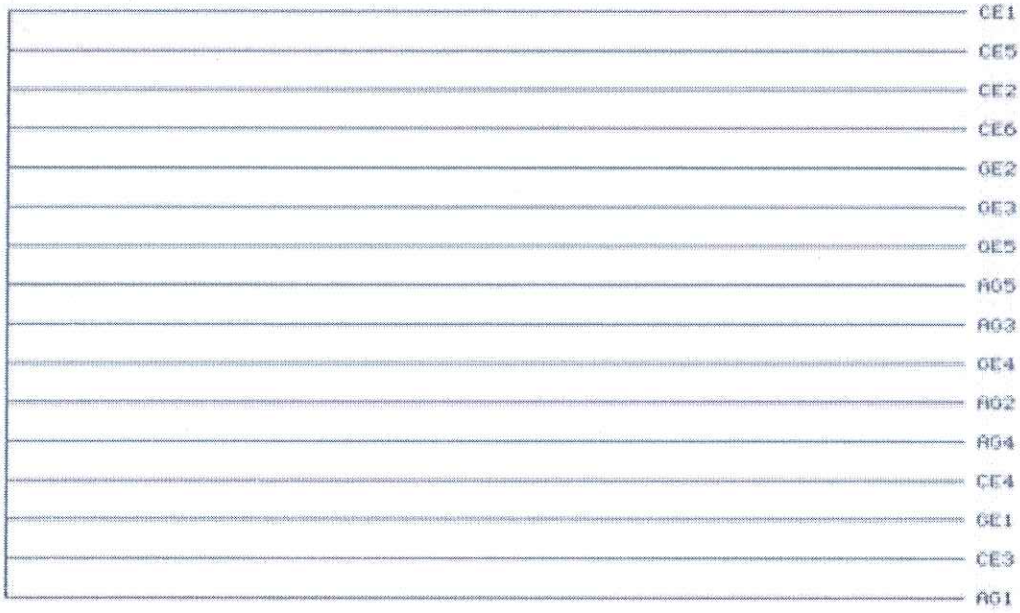
en iyi parsimonik ağaçların skoru (basamak sayısı) 172 olarak bulunmuştur. Analiz sonucunda oluşturulan 1 numaralı ağaç Şekil 4.1 'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: ITS bölgesine ait diziler kullanılarak oluşturulan 1 numaralı ağaç

Şekil 4.1'de görüldüğü gibi Çelebil ve Ayva-Gemlikl birbirinden ve diğerlerinden tamamen farklıdır. AG1 örneğine ait ITS dizisi zor elde edilmiştir. Melezlemeden mi yoksa farklı bir nedenden mi kaynaklandığı bilinmemektedir. Clustal hizalamasında diğer örneklerden bariz farklılıklar olduğu ortaya çıkmıştır. Fakat AG1 örneğine ait en temiz elde edebildiğimiz tek sonuç bu dizi verisidir ve bununda kirlilik oranı yüksektir. Parsimonik bilgi içeren karakter sayısı az olduğundan çeşitler arasında ITS verileri kullanılarak akrabalık ilişkileri elde edilemedi. Tek bir dalda farklılıklar vardır. Fakat bu durum diğerleri ile akrabalığı göstermez. Ağaç da derin filogeni sözkonusudur.

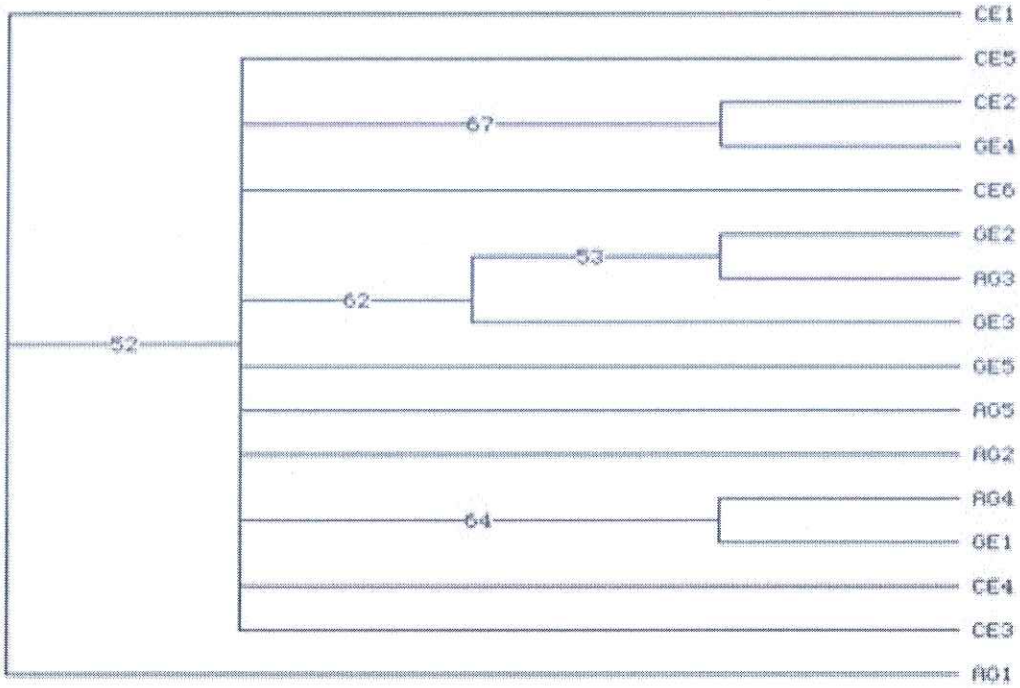
Maksimum parsimoni kriterinde Heuristic araştırma sonucunda oluşturulan 1000 ağacın ortak karar (konsensus) ağacı oluşturulmuştur. Oluşturulan ağaç Şekil 4.2'de sunulmuştur. Ağaç tamamen politomiden oluştuğu için, bu veri kullanılarak çeşitler arasında ayırım yapılamamıştır.



Şekil 4.2: Parsimoni ile elde edilen 1000 ağacın strict konsensusu

Bu analizlerin yanında ayrıca maksimum parsimoni yönteminde bootstrap analizi de yapılmıştır (Bkz. Şekil 4.3). Bu yöntem elde edilen ağaçların dallarının parsimoni kriteri kullanılarak istatistiksel yönden en güvenilir olan dallarını belirlemede kullanılır. Her bir dalın yüzdelik olarak ne oranda desteklendiğini gösterir. Eğer yapılan destek %50'nin altında ise program bu dalı çok zayıf olarak nitelendirir ve oraya güvenilemeyeceği için çökertir, çöken dal sonucunda oluşan basamaklanmamış dallanma ise politomi olarak adlandırılır.

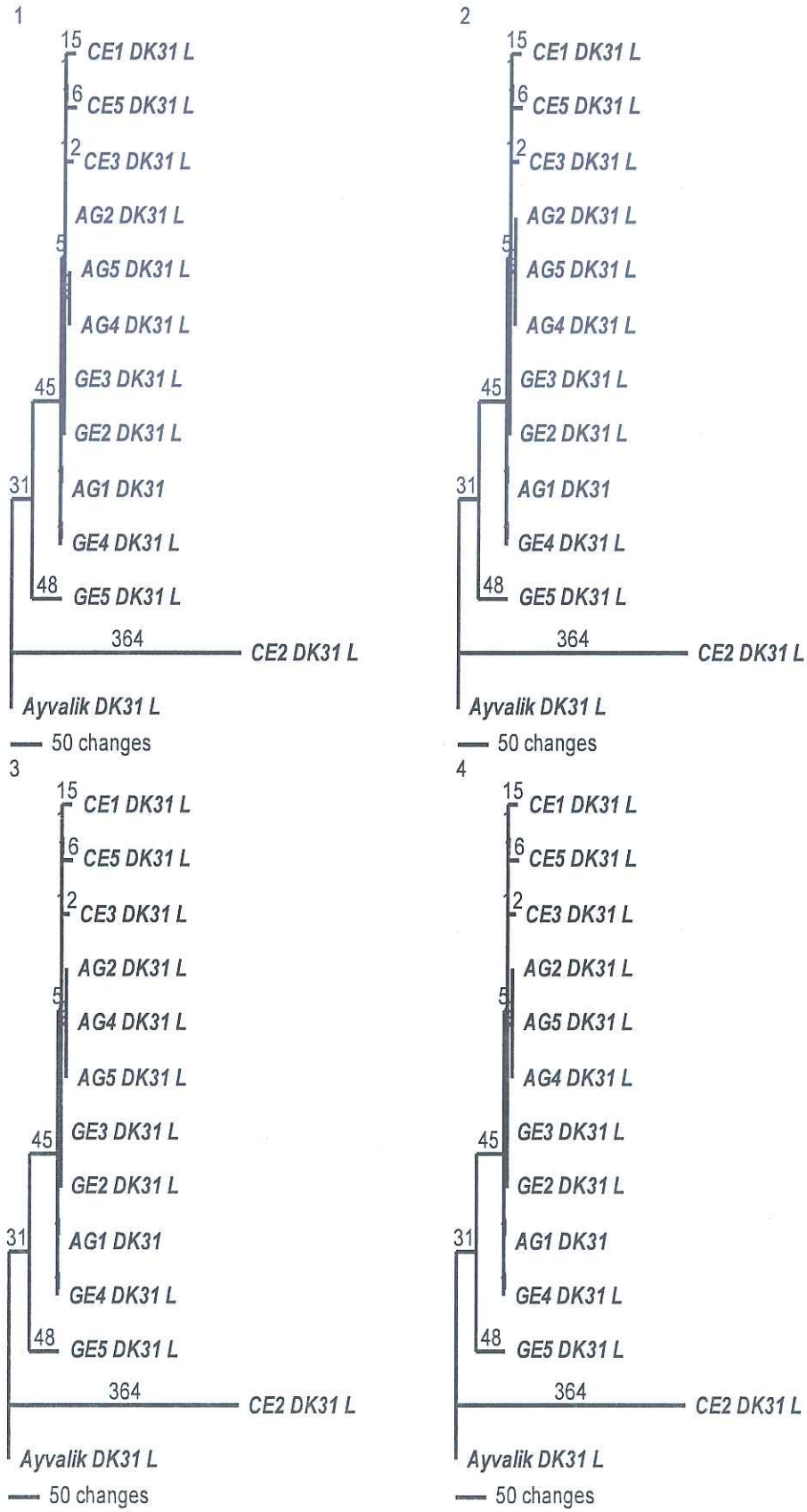
Şekil 4.3'de oluşturulan bootstrap ağacı, maksimum ağaç sayısı 1000 seçilerek ve 100 tekrar (replicate) yapılarak elde edilmiştir. Şekil 4.3'de görüldüğü gibi bootstrap analizi sonucunda oluşan ağaçta pek çok dal çökmüştür. Bunun nedeni giriş bölümünde bahsedildiği gibi; o dal için bootstrap desteğinin % 50'nin altında kalmasıdır. Ağacın bu kısmındaki dallanma modeli belirlenemediğinden güvenilebilir yorum yapılamaz. Sadece bu dal tek düğümden çok çatallı olarak ayrılmıştır ve dallarda politomi oluşmuştur ve ilişkiler bu markıra dayalı olarak çözümlenememiştir denilebilir.



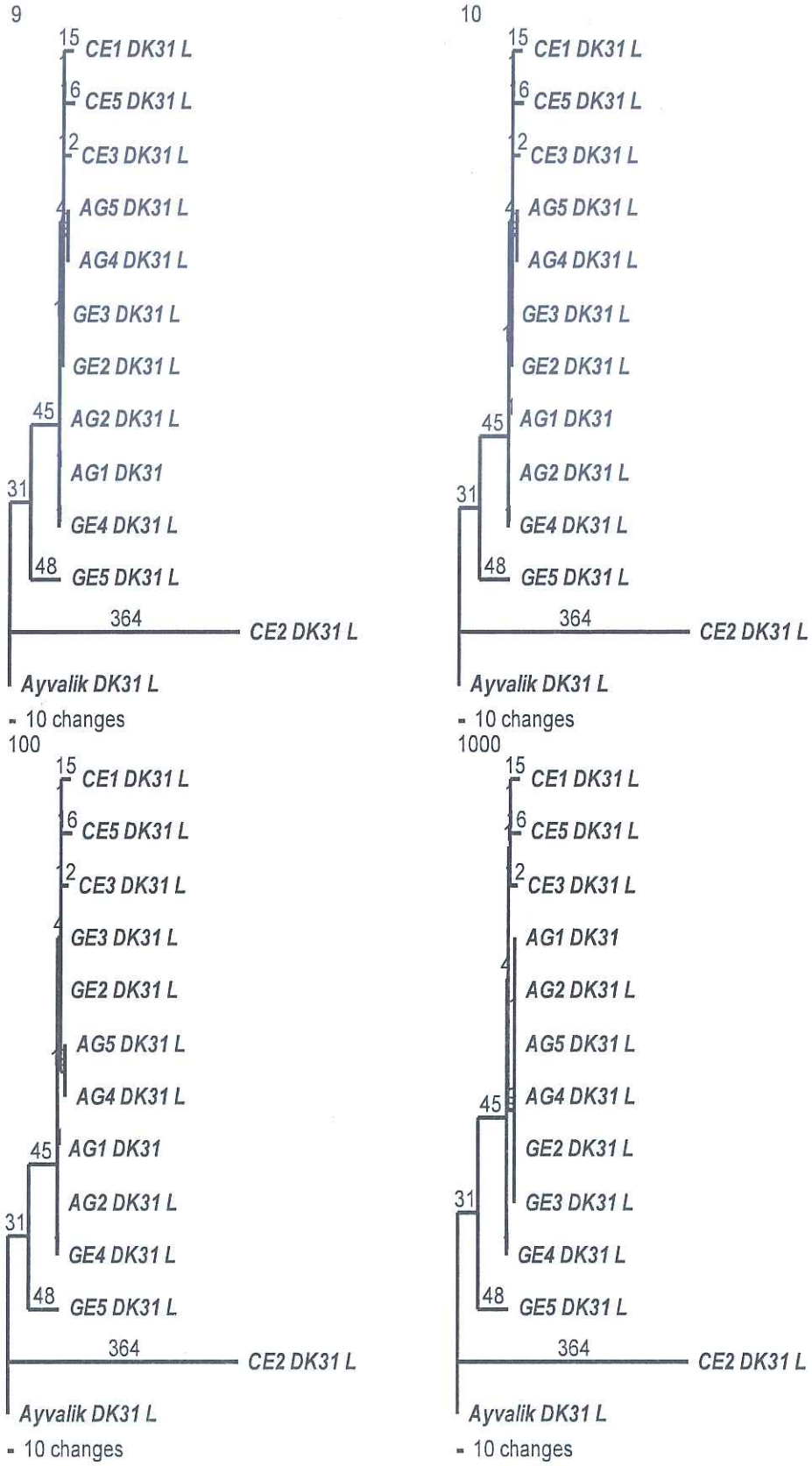
Şekil 4.3: ITS dizilerine ait bootstrap analizi sonucunda oluşan parsimoni ağacı

DK31 bölgesine ait diziler kullanılarak yapılan parsimoni analizinde toplam 836 karakter incelenmiş ve bunlardan 496 karakter sabit (constant) karakterli, 321 karakter değişken karakterli, parsimonik bilgi içeren karakter sayısı ise 19 çıkmıştır. Heuristic arama sonucunda toplam 16 383 farklı ağaç topolojisi oluşturulmuş ve en iyi parsimonik ağaçların skoru (basamak sayısı) 352 olarak bulunmuştur.

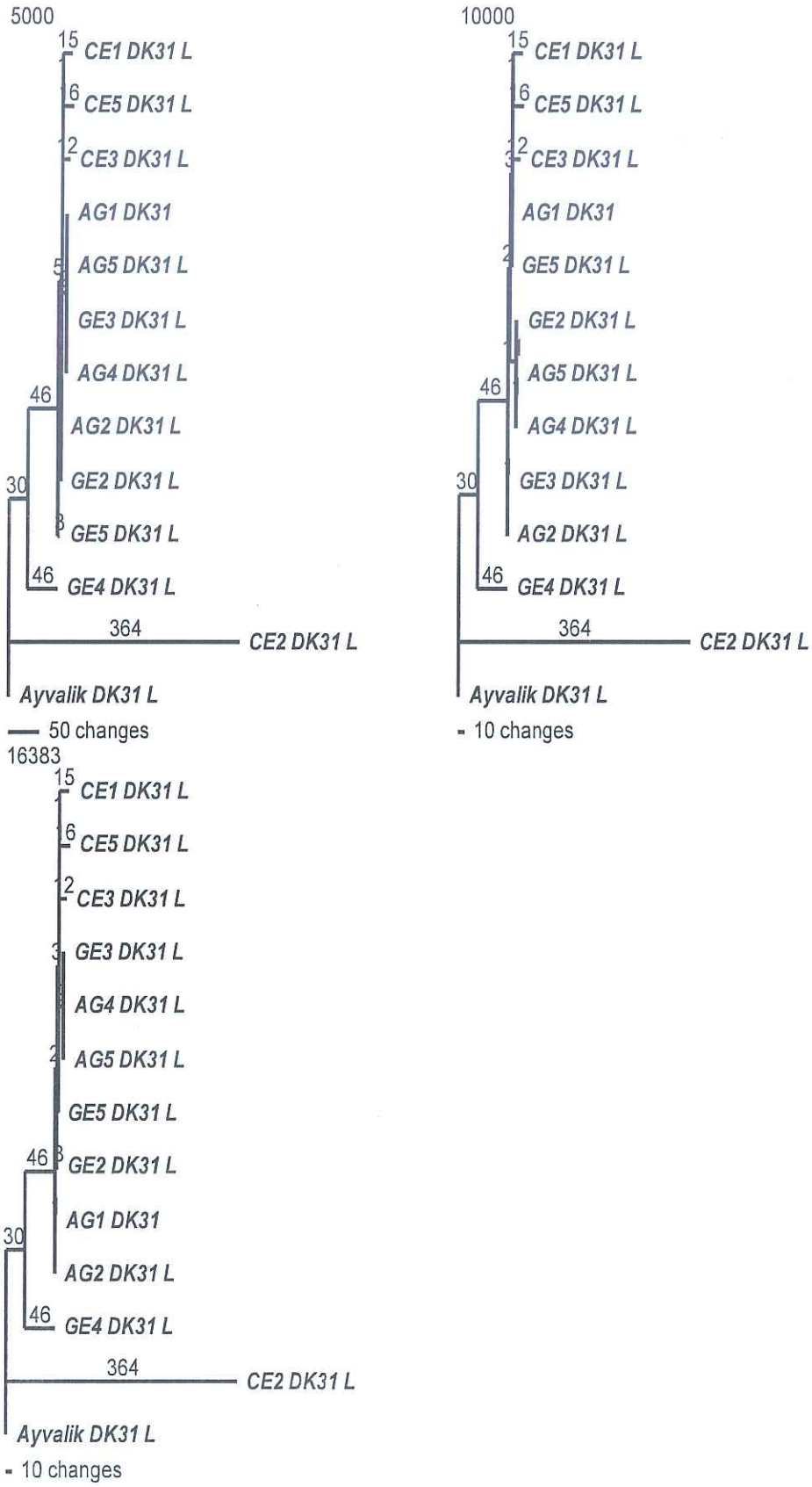
Karakter temelli yöntemlerden Maksimum Parsimoni kriteri kullanılarak Heuristic araştırma yapıldı. Bu arama için oluşturulacak maksimum ağaç sayısı 10,000 olarak seçildi. Yapılacak aramada oluşacak dalları değerlendirmek için kullanılan algoritma TBR (Tree-Bisection-Reconnection) olarak seçildi. Tüm karakter tipleri sırasız (unordered) ve eşit ağırlıkta olacak şekilde ayarlandı. Yapılan analiz sonucunda 16 383 ağaç elde edildi. Arama sonucunda oluşan 16 383 filogenetik ağaçtan 1, 2, 3, 4, 9, 10, 100, 1000, 5000, 10000 ve 16383 numaralı ağaçlar Şekil 4.4-4.5-4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.4: Parsimoni kriteri kullanılarak elde edilen 1, 2, 3 ve 4 numaralı ağaçlar

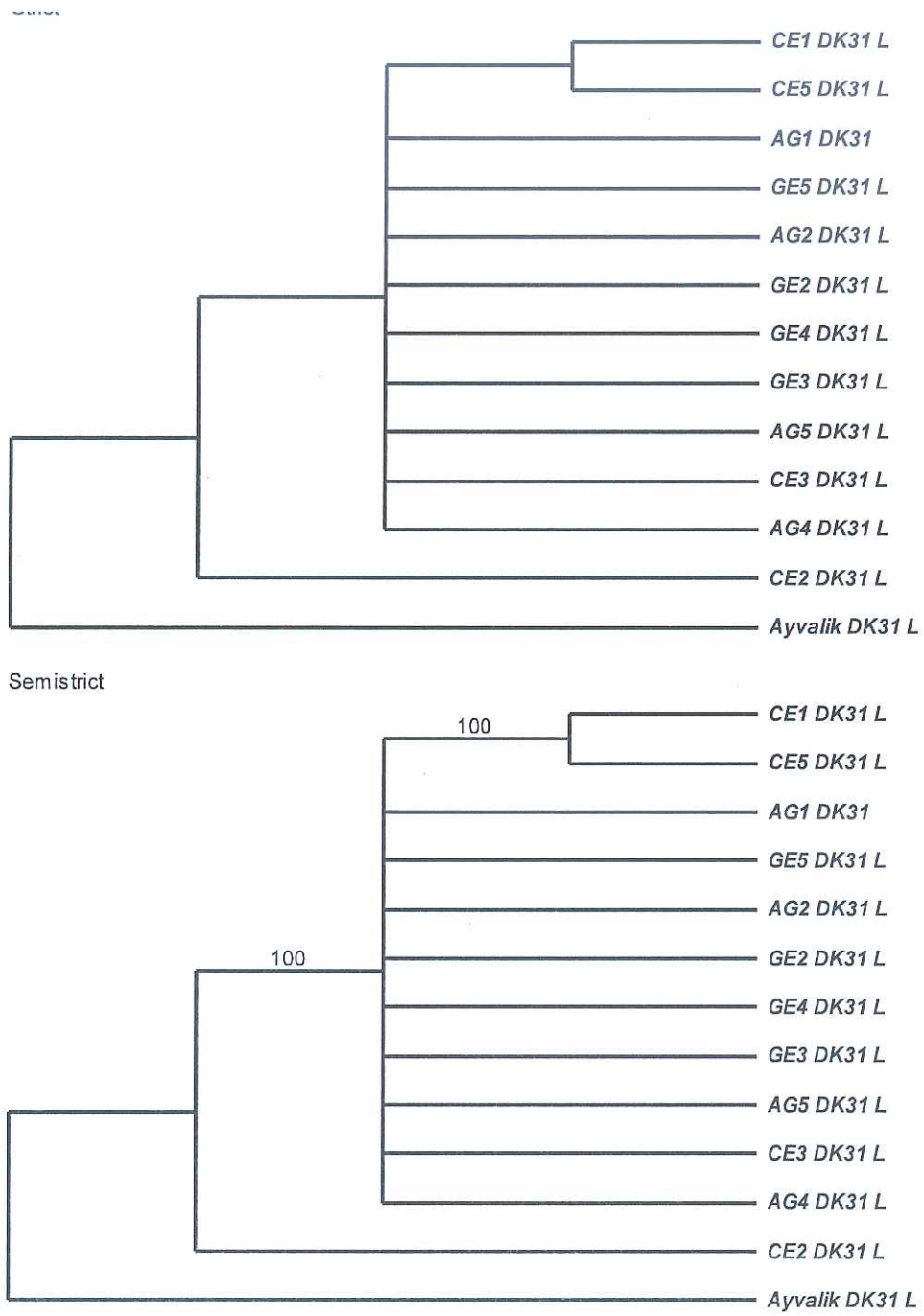


Şekil 4.5: Parsimoni kriteri kullanılarak oluşturulan 9, 10, 100 ve 1000 numaralı ağaçlar

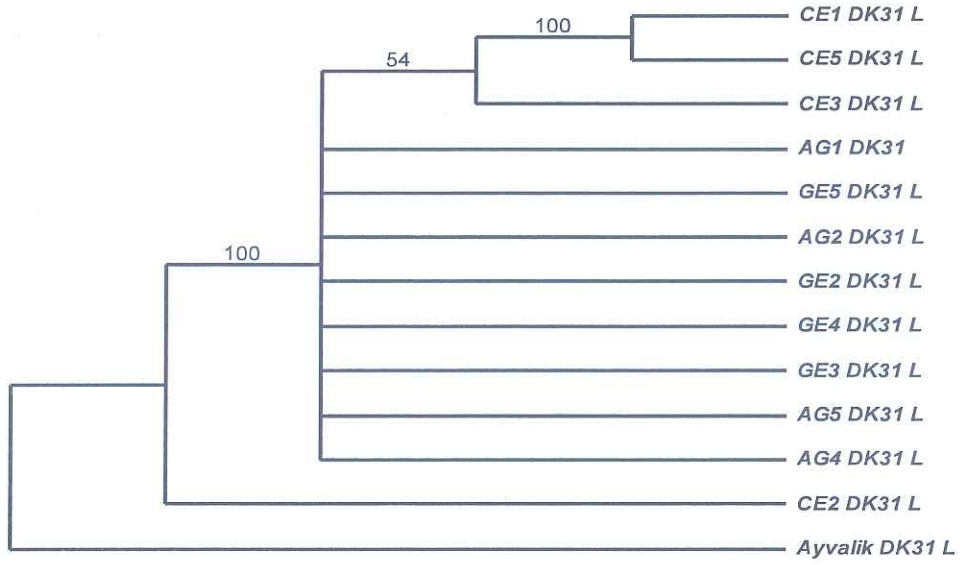


Şekil 4.6: Parsimoni kriteri kullanılarak elde edilen 5000, 10000 ve 16383 numaralı ağaçlar

Maksimum Parsimoni kriterinde Heuristic araştırma sonucunda oluşturulan 16 383 ağacın ortak karar (konsensus) ağacı, Majority Rule (Bkz. Şekil 4.8) ve Semi-strict konsensus ağacı oluşturulmuştur. Oluşturulan ağaçlar Şekil 4.7 ve Şekil 4.8’de sunulmuştur.

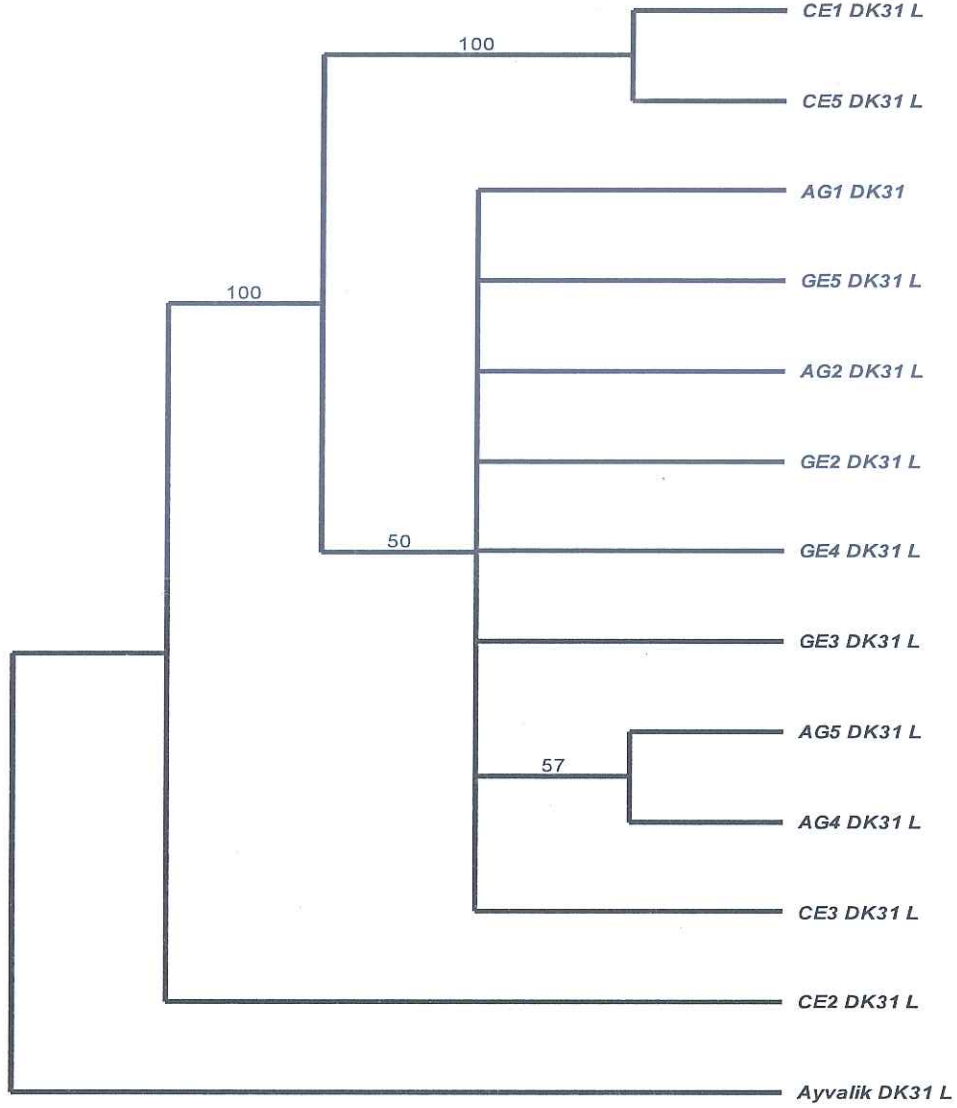


Şekil 4.7: Parsimoni ile elde edilen 16383 ağacın strict ve semi-strict konsensusu



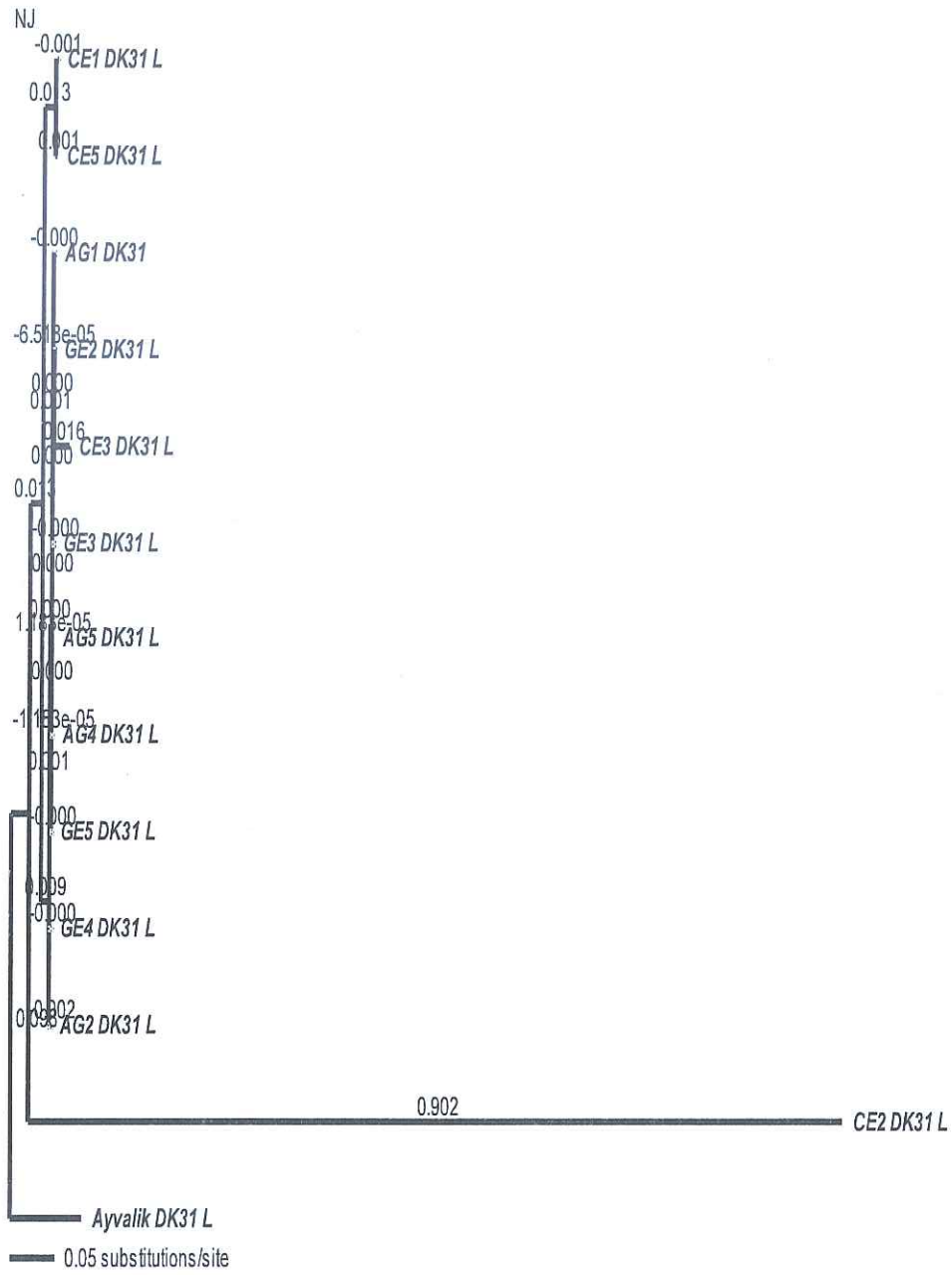
Şekil 4.8: Parsimoni ile elde edilen 16383 ağacın Majority rule ağacı

Bu analizlerin yanında ayrıca maksimum parsimoni yönteminde Bootstrap analizi yapılmıştır (Bkz. Şekil 4.9). Şekil 4.9’da oluşturulan Bootstrap ağacı, maksimum ağaç sayısı 1000 seçilerek ve 100 tekrar (replicate) yapılarak elde edilmiştir. Şekil 4.9’da görüldüğü gibi bootstrap analizi sonucunda oluşan ağaçta pek çok dal çökmüştür. Bunun nedeni giriş bölümünde bahsedildiği gibi; o dal için bootstrap desteğinin %50’nin altında kalmasıdır. Ağacın bu kısmındaki dallanma modeli belirlenemediğinden güvenilebilir bir yorum yapılamaz. Yine de DK31 yönüyle Gemlik çeşidine ait örnekler ve Ayva-Gemlik’e ait örnekler arasında çok fazla farklılık yoktur. Hatta ikisinin de “Gemlik çeşidi” olduğu söylenebilir. Ayva-Gemlik’e ait örnekler ile Gemlik çeşidine ait örneklerin DK31 dizileri tamamen aynı gözükmemektedir. Dolayısıyla diziler incelendiğinde polimorfizm gözükmemektedir. Fakat DK31 yönüyle Çelebiler arasında polimorfizm bulunmaktadır. Dolayısıyla Çelebi- Gemlik çeşitleri bu markır yardımıyla aralarında rahatça ayrılırken, Çelebiler dahi kendi içlerinde ayrılabilir. Hatta Çelebi3 DK31 yönüyle diğer çelebilerden özellikle Ayva-Gemlik’ten çok farklı DK31 dizisine sahip olup, adeta farklı bir çeşit gibi gözükmemektedir. Şekil 4.9’da oluşturulan bootstrap ağacında görüldüğü gibi Gemlik-Ayva Gemlik’ler arasında fazla destek yoktur ve yeterli polimorfizm görülmemektedir.



Şekil 4.9: Bootstrap analizi sonucunda oluşan parsimoni ağacı

Maksimum Parsimoni yöntemine ek olarak mesafe temelli yöntemlerden UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average) ve NJ (neighbor joining) analizleri de yapılmıştır. UPGMA Analizi sonucu oluşan filogenetik ağaç Şekil 4.10'da, NJ Analizi sonucu oluşan filogenetik ağaç Şekil 4.11'da gösterildiği gibidir.



Şekil 4.11: Neighbor-Joining (NJ) Analizi sonucunda oluşan ağaç

Bu çalışmada, zeytin çeşitleri arasındaki genetik çeşitliliğinin ortaya konmasında ve taksonomik ve filogenetik ilişkilerin doğru bir şekilde belirlenmesinde her iki çekirdek (nuclear) markırıda (ITS ve DK31) kullanıldı. ITS dizi varyasyonlarının yakın ilişkili türleri ayırmada daima yeterli olmadığı anlaşıldı. Fakat DK31 bölgesinin populasyon içi bazı bireyleri ayırmada yeterli olduğu görülmüştür. DK31 düşük düzeyde polimorfizm göstermiştir. Bu ağaçlar (DK31'e ait) heterozigotluk dikkate alınmadan yapılmıştır. Fakat daha sonra yapılan yayın aşamasındaki analizlerde dikkate alınacaktır. Yukarıda sunulan DK31 dizilerine ait ağaçlarda heterozigotlar dikkate alınmadığından, genetik farklılıklar var gibi görünmesine rağmen Gemlikler ile Ayva-Gemlik birbirinin tıpkısı olduğu ve Çelebilerinde birbirinin çok benzeri olduğu ortaya çıkmıştır. Yine de bu markır (DK31) çeşit içi ayrımı az da olsa göstermektedir ve çeşitleri ayırmak için iyi bir markır olduğu söylenebilir. DK31 markırının kolaylıkla çoğaltılıp dizilenebilme ve polimorfizmleri ortaya çıkarma özelliğinden dolayı ileride angiospermlerin filogenetik analizinde kullanımı söz konusudur.

5. KAYNAKLAR

- [1] Rhizopoulou, S., "Olea Europaea: A Botanical Contribution to Culture", *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 2, 382-387, (2007).
- [2] El, S.N. and Karakaya, S., "Olive Tree (Olea Europaea) Leaves: Potential Beneficial Effects on Human Health", *Nutr Rev*, 67(11), 632-8, (2009).
- [3] Guerin, Jr., Sweeney, S.M., Collins, G.G., and Sedgley, M., "The Development of a Genetic Database to Identify Olive Cultivars", *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127(6), 977-983, (2002).
- [4] Bailey, C.D., Carr, T.G., Harris, S.A., and Hughes, C.E., "Characterization of Angiosperm Nrdna Polymorphism, Paralogy, and Pseudogenes", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 435-455, (2003).
- [5] Besnard, G., Rubio de Casas, R., and Vargas, P., "Plastid and Nuclear DNA Polymorphism Reveals Historical Processes of Isolation and Reticulation in the Olive Tree Complex (Olea Europaea)", *Journal of Biogeography*, 34(4), 736-752, (2006).
- [6] Sang, T., "Utility of Low-Copy Nuclear Gene Sequences in Plant Phylogenetics", *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37(3), 121-147, (2002).
- [7] Davis, P.H., "Flora of Turkey: And the East Aegean Islands.(Supplement)". Edinburgh University Press, (1965).
- [8] Conde, C., Delrot, S., and Gerós, H., "Physiological, Biochemical and Molecular Changes Occurring During Olive Development and Ripening", *Journal of Plant Physiology*, 165(15), 1545-1562, (2008).
- [9] Green, P., "A Revision of Olea L.(Oleaceae)", *Kew Bulletin*, 91-140, (2002).
- [10] Baldoni, L. and Belaj, A., *Olive*, in *Oil Crops*. 2010, Springer. p. 397-421.
- [11] Rabiei, Z. and Enferadi, S.T., "Traceability of Origin and Authenticity of Olive Oil").
- [12] Alagna, F., D'Agostino, N., Torchia, L., Servili, M., Rao, R., Pietrella, M., Giuliano, G., Chiusano, M.L., Baldoni, L., and Perrotta, G., "Comparative

454 Pyrosequencing of Transcripts from Two Olive Genotypes During Fruit Development", *BMC genomics*, 10(1), 399, (2009).

- [13] Besnard, G., Rubio de Casas, R., Christin, P.A., and Vargas, P., "Phylogenetics of *Olea* (Oleaceae) Based on Plastid and Nuclear Ribosomal DNA Sequences: Tertiary Climatic Shifts and Lineage Differentiation Times", *Annals of Botany*, 104(1), 143-160, (2009).
- [14] Rugini, E., Pace, C., Gutierrez-Pesce, P., and Muleo, R., "*Olea*", *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*, 79-117, (2011).
- [15] Gomes, S., Martins-Lopes, P., and Guedes-Pinto, H., "Olive Tree Genetic Resources Characterization through Molecular Markers", *Genetic Diversity*, 15-28, (2012).
- [16] Štambuk, S., Sutlović, D., Bakarić, P., Petričević, S., and Anđelinović, Š., "Forensic Botany: Potential Usefulness of Microsatellite-Based Genotyping of Croatian Olive (*Olea Europaea* L.) in Forensic Casework", *Croatian medical journal*, 48(4), 556, (2007).
- [17] Rugini, E. and Baldoni, L., "15.1 *Olea Europaea* Olive", *General Editor: Gabrielle J. Persley, The Doyle Foundation, Glasgow, Scotland.*, 404, (2005).
- [18] Bracci, T., Busconi, M., Fogher, C., and Sebastiani, L., "Molecular Studies in Olive (*Olea Europaea* L.): Overview on DNA Markers Applications and Recent Advances in Genome Analysis", *Plant Cell Reports*, 30(4), 449-462, (2011).
- [19] Ercisli, S., Ipek, A., and Barut, E., "Ssr Marker-Based DNA Fingerprinting and Cultivar Identification of Olives (*Olea Europaea*)", *Biochem Genet*, 49(9-10), 555-61, (2011).
- [20] Rubio de Casas, R., Besnard, G., Schönswetter, P., Balaguer, L., and Vargas, P., "Extensive Gene Flow Blurs Phylogeographic but Not Phylogenetic Signal in *Olea Europaea* L", *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 113(4), 575-583, (2006).
- [21] Rallo, P., Tenzer, I., Gessler, C., Baldoni, L., Dorado, G., and Martin, A., "Transferability of Olive Microsatellite Loci across the Genus *Olea*", *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 107(5), 940-946, (2003).
- [22] Besnard, G., Baradat, P., Chevalier, D., Tagmount, A., and Bervillé, A., "Genetic Differentiation in the Olive Complex (*Olea Europaea*) Revealed by Raps and Rflps in the Rrna Genes", *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48(2), 165-182, (2001).
- [23] Hannachi, H., Breton, C., Msallem, M., El Hady, S.B., El Gazzah, M., and Bervillé, A., "Genetic Relationships between Cultivated and Wild Olive

- Trees (*Olea Europaea* L. Var. *Europaea* and Var. *Sylvestris*) Based on Nuclear and Chloroplast Ssr Markers", *Nat. Res*, 1, 95-103, (2010).
- [24] Sesli, M. and Yegenoglu, E.D., "Genetic Relationships among and within Wild and Cultivated Olives Based on Rapsds", *Genet Mol Res*, 9(3), 1550-6, (2010).
- [25] Hernandez, M.L., Padilla, M.N., Mancha, M., and Martinez-Rivas, J.M., "Expression Analysis Identifies Fad2-2 as the Olive Oleate Desaturase Gene Mainly Responsible for the Linoleic Acid Content in Virgin Olive Oil", *J Agric Food Chem*, 57(14), 6199-206, (2009).
- [26] San Mauro, D. and Agorreta, A., "Molecular Systematics: A Synthesis of the Common Methods and the State of Knowledge", *Cellular & molecular biology letters*, 15(2), 311-341, (2010).
- [27] Small, R.L., Cronn, R.C., and Wendel, J.F., "Las Johnson Review No. 2. Use of Nuclear Genes for Phylogeny Reconstruction in Plants", *Australian Systematic Botany*, 17(2), 145-170, (2004).
- [28] Hughes, C.E., Eastwood, R.J., and Bailey, C.D., "From Famine to Feast? Selecting Nuclear DNA Sequence Loci for Plant Species-Level Phylogeny Reconstruction", *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1465), 211-225, (2006).
- [29] Besnard, G., Khadari, B., Baradat, P., and Bervillé, A., "Combination of Chloroplast and Mitochondrial DNA Polymorphisms to Study Cytoplasm Genetic Differentiation in the Olive Complex (*Olea Europaea* L.)", *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 105(1), 139-144, (2002).
- [30] Khan, S. and Spoor, W., "Use of Molecular and Morphological Markers as a Quality Control in Plant Tissue Culture", *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(4), 479-482, (2001).
- [31] Agarwal, M., Shrivastava, N., and Padh, H., "Advances in Molecular Marker Techniques and Their Applications in Plant Sciences", *Plant Cell Reports*, 27(4), 617-631, (2008).
- [32] Hadidi, A. and Candresse, T., "Polymerase Chain Reaction", *Viroids*, 115-122, (2003).
- [33] Blears, M., De Grandis, S., Lee, H., and Trevors, J., "Amplified Fragment Length Polymorphism (Aflp): A Review of the Procedure and Its Applications", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21(3), 99-114, (1998).
- [34] Okogbenin, E., Marin, J., and Fregene, M., "An Ssr-Based Molecular Genetic Map of Cassava", *Euphytica*, 147(3), 433-440, (2006).

- [35] Álvarez, I. and Wendel, J.F., "Ribosomal ITS Sequences and Plant Phylogenetic Inference", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3),417-434, (2003).
- [36] Soltis, P.S., Soltis, D.E., and Doyle, J.J., "Molecular Systematics of Plants". Chapman and Hall New York, (1992).
- [37] Calonje, M., Martín-Bravo, S., Dobeš, C., Gong, W., Jordon-Thaden, I., Kiefer, C., Kiefer, M., Paule, J., Schmickl, R., and Koch, M.A., "Non-Coding Nuclear DNA Markers in Phylogenetic Reconstruction", *Plant Systematics and Evolution*, 282(3), 257-280, (2009).
- [38] Casey, D., "Primer on Molecular Genetics". US Department of Energy, Office of Energy Research, Office of Health and Environmental Research, (1992).
- [39] Ansorge, W.J., "Next-Generation DNA Sequencing Techniques", *New biotechnology*, 25(4), 195-203, (2009).
- [40] Baxevanis, A.D. and Ouellette, B.F., "Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins". Wiley. com, (2004).
- [41] Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning". Cold spring harbor laboratory press New York, (1989).
- [42] Larkin, M., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., and Lopez, R., "Clustal W and Clustal X Version 2.0", *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948, (2007).
- [43] Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G., and Gibson, T.J., "Multiple Sequence Alignment with Clustal X", *Trends in biochemical sciences*, 23(10), 403-405, (1998).
- [44] Saitou, N. and Imanishi, T., "Relative Efficiencies of the Fitch-Margoliash, Maximum-Parsimony, Maximum-Likelihood, Minimum-Evolution, and Neighbor-Joining Methods of Phylogenetic Tree Construction in Obtaining the Correct Tree", *Mol. Biol. Evol.*, 6(5), 514-525, (1989).
- [45] Singh, G., "Plants Systematics: An Integrated Approach". Science Publishers, (2004).
- [46] Swofford, D., "Paup*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 4.0 B10", (2003).
- [47] Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., and van der Mark, P., *Mrbayes 3.1 Manual*, 2005.

- [48] Dündar, E., Suakar, Ö., Unver, T., and Dagdelen, A., "Isolation and Expression Analysis of Cdnas That Are Associated with Alternate Bearing in *Olea Europaea* L. Cv. Ayvalık", *BMC genomics*, 14(1), 219, (2013).
- [49] Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B., "A Plant DNA Miniprep: Version II", *Plant molecular biology reporter*, 1(4), 19-21, (1983).
- [50] Pirttilä, A.M., Hirsikorpi, M., Kämäräinen, T., Jaakola, L., and Hohtola, A., "DNA Isolation Methods for Medicinal and Aromatic Plants", *Plant molecular biology reporter*, 19(3), 273-273, (2001).
- [51] White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J., "Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics", *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18, 315-322, (1990).

EKLER

6. EKLER

6.1 EK A Çalışmada Kullanılan Primerlerin Referansları

ITS5A: Kenneth J. Wurdack tarafından dizayn edilmiştir [51].

ITS4: Bruce G. Baldwin tarafından dizayn edilmiştir [51].

DK31ampR ve DK31ampL: Suakar, Ö. (2012). Zeytin cDNA kütüphanelerinin moleküler karakterizasyonu ve önemli genlerin tespiti. Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı*, Balıkesir. İlk kez Suakar (2012) tarafından yapılan tezde sunulmuş olup daha sonra yayınlanacaktır.

6.2 EK B ClustalW'da Hizalanmış ITS5A nrDNA Dizisinin Veri Matrisi

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

ÇE1      -----AAGGTTTTCCGTAGGTGA-CCTGCGGAAGGATCATTGT--CG 39
ÇE5      -----TCGTAAYAAGGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGT--CG 47
ÇE2      -----TTAAAGGT-TTTCCTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGT--CG 43
ÇE6      -----TCCGTAAGTGA-CCTGCGGAAGGATCATTGT--CG 32
GE2      -----GGTGA-CCTGCGGA-GGATCATTGT--CG 26
GE3      -----TGA-CCTGCGGA-GGATCATCGCGTCG 25
GE5      GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG-TTTCCTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGT--CG 57
AG5      ----GGAGAAGTCGTAACAAGG-TTTCCTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGT--CG 53
AG3      -----GTACAAGG-TT-CCTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGT--CG 42
GE4      -----GGG-TTTCCTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGT--CG 38
AG2      -----CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGT--CG 31
AG4      -----TTCTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGT--CG 33
ÇE4      -----AAGTCGTAACAAGG-TTTCCTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGT--CG 49
GE1      -----GGTTKCTCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGT--CG 38
ÇE3      -----CAGGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTGT--CG 39
AG1      -----TGAACCTGCGGAAGGATCATTGT--CG 25
                *** ***** ***** * **

ÇE1      AA--CCTGCGAGGCAGA----CCC-GCGAACCCGTTCCACGACACGCGCGGGAGGACGAC 92
ÇE5      AAA-CCTGCGAGGCAGA----CCCCGGAACCCGTTCCACGACACGCGCGGGAGGACGAC 102
ÇE2      AAA-CCTGCGAGGCAGA----CCC-GCGAACCCGTTCCACGACACGCGCGGGAGGACGAC 97
ÇE6      AAA-CCTGCGAGGCAGA----CCC-GCGAACCCGTTCCACGACACGCGCGGGAGGACGAC 86
GE2      AAAACCTGCGAGGCAGA----CCCCGGAACCCGTTCCACGACACGCGCGGGAGGACGAC 82
GE3      AA--CCTGCGAGGCAGA----CCC-GCGAACCCGTTCCACGACACGCGCGGGAGGACGAC 78
GE5      AAA-CCTGCGAGGCAGA----CCC-GCGAACCCGTTCCACGACACGCGCGGGAGGACGAC 111
AG5      AAA-CCTGCGAGGCAGA----CCC-GCGAACCCGTTCCACGACACGCGCGGGAGGACGAC 107
AG3      AAA-CCTGCGAGGCAGA----CCC-GCGAACCCGTTCCACGACACGCGCGGGAGGACGAC 96
GE4      AAA-CCTGCGAGGCAGA----CCCCGGAACCCGTTCCACGACACGCGCGGGAGGACGAC 93
AG2      AAA-CCTGCGAGGCAGA----CCC-GCGAACCCGTTCCACGACACGCGCGGGAGGACGAC 85
AG4      AA--CCTGCGAGGCAGA----CCC-GCGAACCCGTTCCACGACACGCGCGGGAGGACGAC 86
ÇE4      AAA-CCTGCGAGGCAGA----CCC-GCGAACCCGTTCCACGACACGCGCGGGAGGACGAC 103
GE1      AAA-CCTGCGAGGCAGA----CCC-GCGAACCCGTTCCACGACACGCGCGGGAGGACGAC 92
ÇE3      AAA-CCTGCGAGGCAGA----CCC-GCGAACCCGTTCCACGACACGCGCGGGAGGACGAC 93
AG1      AAA-CCTGCMAGCAGAACGACCC-GCGAACACGTT--AMCACMC-CGGGTGAGGG-ATT 79
                ** ***** * ***** *** ***** **** * ** * ** * ** * **

ÇE1      GCGGGCGCGATCGAAGGGTCGCCCCGAGYCGGAGACCCGCTCCGTCGACG--CGCGCGCR 150
ÇE5      GCGGGCGCGATCGAAGGGTCGCCCCGAGYCGGAGACCCGCTCCGTCGACG--CGCGCGCA 160
ÇE2      GCGGRCGCGATCGAAGGGTCGCCCCGGRYCGGAGACCCGCTCCGTCGACG--CGCGCGCA 155
ÇE6      GCGGRCGCGATCGAAGGGTCGCCCCGAGYCGGAGACCCGCTCCGTCGACG--CGCGCGCA 144
GE2      GCGGACGCGATCGAAGGGTCGCCCCGAGCCGAGACCCGCTCCGTCGACG--CGCGCGCA 140
GE3      GCGGACGCGATCGAAGGGTCGCCCCGAGCCGAGACCCGCTCCGTCGACG--CGCGCGCA 136
GE5      GCGGGCGCGATCGAAGGGTCGCCCCGAGCCGAGACCCGCTCCGTCGACG--CGCGCGCA 169
AG5      GCGGRCGCGATCGAAGGGTCGCCCCGAGCCGAGACCCGCTCCGTCGACG--CGCGCGCA 165
AG3      GCGGACGCGATCGAAGGGTCGCCCCGAGCCGAGACCCGCTCCGTCGACG--CGCGCGCA 154
GE4      GCGGGCGCGATCGAAGGGTCGCCCCGAGCCGAGACCCGCTCCGTCGACG--CGCGCGCA 151
AG2      GCGGGCGCGATCGAAGGGTCGCCCCGAGCCGAGACCCGCTCCGTCGACG--CGCGCGCA 143
AG4      GCGGGCGCGATCGAAGGGTCGCCCCGAGCCGAGACCCGCTCCGTCGACG--CGCGCGCA 144
ÇE4      GCGGGCGCGATCGAAGGGTCGCCCCGAGYCGGAGACCCGCTCCGTCGACG--CGCGCGCA 161
GE1      GCGGGCGCGATCGAAGGGTCGCCCCGAGYCGGAGACCCGCTCCGTCGACG--CGCGCGCA 150
ÇE3      GCGGGCGCGATCGAAGGGTCGCCCCGAGYCGGAGACCCGCTCCGTCGACG--CGCGCGCA 151
AG1      GGGGGTGCG--CAM----KTTCCCAAGTCGCGAACCCAT--GGTGGGGATTGCCCTSW 131
                * ** *** * ***** * ** ***** ***** * ** *

ÇE1      AG-CGCCCCTCGCACGGCCYAACGAACCCC-GGCGCG-AAAAGCGTCAAGGAACACTCAA 207
ÇE5      AG-CGCCCCTCGCACGGCCYAACGAACCCC-GGCGCG-AAAAGCGTCAAGGAACACTCAA 217
ÇE2      AG-CGCCCCTCGCACGGCCYAACGAACCCC-GGCGCG-AAAAGCGTCAAGGAACACTCAA 212
ÇE6      AG-CGCCCCTCGCACGGCCYAACGAACCCC-GGCGCG-AAAAGCGTCAAGGAACACTCAA 201
GE2      AG-CGCCCCTCGCACGGCCYAACGAACCCC-GGCGCG-AAAAGCGTCAAGGAACACTCAA 197
GE3      AG-CGCCCCTCGCACGGCCYAACGAACCCC-GGCGCG-AAAAGCGTCAAGGAACACTCAA 194
GE5      AG-CGCCCCTCGCACGGCCYAACGAACCCC-GGCGCG-AAAAGCGTCAAGGAACACTCAA 226
AG5      AG-CGCCCCTCGCACGGCCYAACGAACCCC-GGCGCG-AAAAGCGTCAAGGAACACTCAA 222
AG3      AG-CGCCCCTCGCACGGCCYAACGAACCCC-GGCGCG-AAAAGCGTCAAGGAACACTCAA 211
GE4      AG-CGCCCCTCGCACGGCCYAACGAACCCC-GGCGCG-AAAAGCGTCAAGGAACACTCAA 208
AG2      AG-CGCCCCTCGCACGGCCYAACGAACCCC-GGCGCG-AAAAGCGTCAAGGAACACTCAA 200
AG4      AG-CGCCCCTCGCACGGCCYAACGAACCCC-GGCGCG-AAAAGCGTCAAGGAACACTCAA 201

```

CE4 AG-CGCCCGTCGCACGGCCYAACGAACCCC-GGCGCG-AAAAGCGTCAAGGAACACTCAA 218
GE1 AG-CGCCCGTCGCACGGCCYAACGAACCCC-GGCGCG-AAAAGCGTCAAGGAACACTCAA 207
CE3 AG-CGCCCGTCGCACGGCCYAACGAACCCC-GGCGCG-AAAAGCGTCAAGGAACACTCAA 208
AG1 GGGTGGTCTCTGCTGAAC-AACGACCCCCGGCGCG-GAATGCCCAAGGAAA--TCAA 187
* *

CE1 GGCG--TCGCTCGCCCCCTCGGTGCCCGGTCGCGGTCGGCACCTCGGGGACAGGGCGTGC 265
CE5 GGCG--TCGCTCGCCCCCTCGGTGCCCGGTCGCGGTCGGCACCTCGGGGACAGGGCGTGC 275
CE2 GGCG--TCGCTCGCCCCCTCGGTGCCCGGTCGCGGTCGGCACCTCGGGGACAGGGCGTGC 270
CE6 GGCG--TCGCTCGCCCCCTCGGTGCCCGGTCGCGGTCGGCACCTCGGGGACAGGGCGTGC 259
GE2 GGCG--TCGCTCGCCCCCTCGGTGCCCGGTCGCGGTCGGCACCTCGGGGACAGGGCGTGC 255
GE3 GGCG--TCGCTCGCCCCCTCGGTGCCCGGTCGCGGTCGGCACCTCGGGGACAGGGCGTGC 252
GE5 GGCG--TCGCTCGCCCCCTCGGTGCCCGGTCGCGGTCGGCACCTCGGGGACAGGGCGTGC 284
AG5 GGCG--TCGCTCGCCCCCTCGGTGCCCGGTCGCGGTCGGCACCTCGGGGACAGGGCGTGC 280
AG3 GGCG--TCGCTCGCCCCCTCGGTGCCCGGTCGCGGTCGGCACCTCGGGGACAGGGCGTGC 269
GE4 GGCG--TCGCTCGCCCCCTCGGTGCCCGGTCGCGGTCGGCACCTCGGGGACAGGGCGTGC 268
AG2 GGCG--TCGCTCGCCCCCTCGGTGCCCGGTCGCGGTCGGCACCTCGGGGACAGGGCGTGC 256
AG4 GGCG--TCGCTCGCCCCCTCGGTGCCCGGTCGCGGTCGGCACCTCGGGGACAGGGCGTGC 259
CE4 GGCG--TCGCTCGCCCCCTCGGTGCCCGGTCGCGGTCGGCACCTCGGGGACAGGGCGTGC 276
GE1 GGCG--TCGCTCGCCCCCTCGGTGCCCGGTCGCGGTCGGCACCTCGGGGACAGGGCGTGC 265
CE3 GGCG--TCGCTCGCCCCCTCGGTGCCCGGTCGCGGTCGGCACCTCGGGGACAGGGCGTGC 266
AG1 ACTGAAGTGAACGCGTCCC----CCCCGTATGCGGGCGGN-----GGA---GGCGTCT 233
* *

CE1 ATCGAAATCG-AAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 324
CE5 ATCGAAATCG-AAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 334
CE2 ATCGAAATCG-AAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 329
CE6 ATCGAAATCG-AAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 318
GE2 ATCGAAATCG-AAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 314
GE3 ATCGAAATCG-AAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 311
GE5 ATCGAAATCG-AAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 343
AG5 ATCGAAATCG-AAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 339
AG3 ATCGAAATCG-AAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 328
GE4 ATCGAAATCG-AAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 325
AG2 ATCGAAATCG-AAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 317
AG4 ATCGAAATCG-AAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 318
CE4 ATCGAAATCG-AAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 335
GE1 ATCGAAATCG-AAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 324
CE3 ATCGAAATCG-AAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 325
AG1 TTCTAAAACACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACG 293
* *

CE1 CAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAGTTTTTGAAC 384
CE5 CAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAGTTTTTGAAC 394
CE2 CAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAGTTTTTGAAC 389
CE6 CAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAGTTTTTGAAC 378
GE2 CAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAGTTTTTGAAC 374
GE3 CAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAGTTTTTGAAC 371
GE5 CAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAGTTTTTGAAC 403
AG5 CAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAGTTTTTGAAC 399
AG3 CAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAGTTTTTGAAC 388
GE4 CAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAGTTTTTGAAC 385
AG2 CAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAGTTTTTGAAC 377
AG4 CAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAGTTTTTGAAC 378
CE4 CAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAGTTTTTGAAC 395
GE1 CAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAGTTTTTGAAC 384
CE3 CAGCAAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAACCATCGAGTTTTTGAAC 385
AG1 TASCAGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCCTGAWCCATCGAGTCTTTGAAC 353
* *

CE1 GCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCGTGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACATCG 444
CE5 GCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCGTGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACATCG 454
CE2 GCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCGTGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACATCG 449
CE6 GCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCGTGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACATCG 438
GE2 GCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCGTGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACATCG 434
GE3 GCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCGTGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACATCG 431
GE5 GCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCGTGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACATCG 463
AG5 GCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCGTGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACATCG 459
AG3 GCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCGTGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACATCG 448
GE4 GCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCGTGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACATCG 445
AG2 GCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCGTGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACATCG 437
AG4 GCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCGTGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACATCG 438
CE4 GCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCGTGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACATCG 455
GE1 GCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCGTGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACATCG 444
CE3 GCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCGTGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACATCG 445
AG1 GCAAGTTGCGCCCCGAGGCCATCGTGCCGAGGGCAGCTCTGCCTGGGCGTCACGCACATCG 413
* *

GE2	GTCAGGCGGGATCACCCG-----	675
GE3	-----	
GE5	GTCAGGC-----	691
AG5	GTCAGGCGGGATCACCC-----	696
AG3	GTCAGGCGGGATCACCC-----	685
GE4	GTCAGGCGG-ATCACCCCG-----	685
AG2	-TCAGGCGGGATCACCCG-----	676
AG4	GTCAGGCGGGATCACCCG-----	677
QE4	GTCAGGCGG-ATCACCCGCTGAG-----	699
GE1	GTCAGGCGG-----	674
QE3	GTCAGGCGGGATCACCCG SYGAGTTTAAGCATATCATTTAACGGAGGAAA-	717
AG1	GTCAGGC-----	649

CE4_DK31_L AA-----AAGCATGAACACGGCCACGAGCA---CCATGATGATAGCAGCAGCGATAG 412
AG3_DK31_L AA-----AAGCATGAACACGGCCACGAGCA---CCATGATGATAGCAGCAGCGATAG 434
GE5_DK31_L AA-----AAGCATGAACACGGCCACGAGCA---CCATGATGATAGCAGCAGCGATAG 469
AG1_DK31_L AA-----AAGCATGAACACGGCCACGAGCA---CCATGATGATAGCAGCAGCGATAG 469
AG2_DK31_L AA-----AAGCATGAACACGGCCACGAGCA---CCATGATGATAGCAGCAGCGATAG 458
GE2_DK31_L AA-----AAGCATGAACACGGCCACGAGCA---CCATGATGATAGCAGCAGCGATAG 474
GE4_DK31_L AA-----AAGCATGAACACGGCCACGAGCA---CCATGATGATAGCAGCAGCGATAG 472
GE3_DK31_L AA-----AAGCATGAACACGGCCACGAGCA---CCATGATGATAGCAGCAGCGATAG 455
AG5_DK31_L AA-----AAGCATGAACACGGCCACGAGCA---CCATGATGATAGCAGCAGCGATAG 461
CE3_DK31_L AA-----AAGCATGAACACGGCCATGAGCA---CCATGATGATAGCAGCAGCGATAG 440
CE6_DK31_L AA-----AAGCATGAACACGGCCATGAGCA---CCATGATGATAGCAGCAGCGATAG 428
GE1_DK31_L AA-----AAGCATGAACACGGCCAYGAGCA---CCATGATGATAGCAGCAGCGATAG 431
AG4_DK31_L AA-----AAGCATGAACACGGCCACGAGCA---CCATGATGATAGCAGCAGCGATAG 452
CE2_DK31_L ATCCCTCCTTGTGC-TCACCATAACCGTGTTCAGGCTTGTGTTCACCGTACCCGTGTTCC 475
* *

CE1_DK31_L CGATTAGGTACGTTTCAAAGATAAACC---TTATAA--ATCCTTAACAAATTATAATATA 492
CE5_DK31_L CGATTAGGTACGTTTCAAAGATAAACC---TTATAA--ATCCTTAACAAATTATAATATA 499
CE4_DK31_L CGATTAGGTACGTTTCAAAGATAAACC---TTAWAA--ATCCTTAAYAAATTATAATATA 467
AG3_DK31_L CGATTAGGTACGTTTCAAAGATAAACC---TTATAA--ATCCTTAATAAATTATAATATA 489
GE5_DK31_L CGATTAGGTACGTTTCAAAGATAAACC---TTATAA--ATCCTTAATAAATTATAATATA 524
AG1_DK31_L CGATTAGGTACGTTTCAAAGATAAACC---TTATAA--ATCCTTAATAAATTATAATATA 524
AG2_DK31_L CGATTAGGTACGTTTCAAAGATAAACC---TTATAA--ATCCTTAATAAATTATAATATA 513
GE2_DK31_L CGATTAGGTACGTTTCAAAGATAAACC---TTATAA--ATCCTTAATAAATTATAATATA 529
GE4_DK31_L CGATTAGGTACGTTTCAAAGATAAACC---TTATAA--ATCCTTAATAAATTATAATATA 527
GE3_DK31_L CGATTAGGTACGTTTCAAAGATAAACC---TTATAA--ATCCTTAATAAATTATAATATA 510
AG5_DK31_L CGATTAGGTACGTTTCAAAGATAAACC---TTATAA--ATCCTTAATAAATTATAATATA 516
CE3_DK31_L CGATTAGGTACGTTTCAAAGATAAACC---TTAAAA--ATCCTTAATAAATTATAATATA 495
CE6_DK31_L CGATTAGGTACGTTTCAAAGATAAACC---TTAAAA--ATCCTTAATAAATTATAATATA 483
GE1_DK31_L CGATTAGGTACGTTTCAAAGATAAACC---TTATAA--ATCCTTAATAAATTATAATATA 486
AG4_DK31_L CGATTAGGTACGTTTCAAAGATAAACC---TTATAA--ATCCTTAATAAATTATAATATA 507
CE2_DK31_L GGCTTATGCTCACCATAACCGTATTCCGGCTTGTGTTTACCGTACCCGTGTTCCGGTTTGC 535
* *

CE1_DK31_L TAATTTGTACATCGCAAATCACGATTTTCATGTTACTACTTTGTTTGTCTTCTTGCAGGTG 552
CE5_DK31_L TAATTTGTACATCGCAAATCACGATTTTCATGTTACTACTTTGTTTGTCTTCTTGCAGGTG 559
CE4_DK31_L TAATTTGTACATCGCAAATCACGATTTTCATGTTACTACTTTGTTTGTCTTCTTGCAGRTG 527
AG3_DK31_L TAATTTGTACATCGCAAATCAMGATTTTCATGTTACTA---TGTTTGTCTTCTTGCAGGTG 546
GE5_DK31_L TAATTTGTACATCGCAAATCAMGATTTTCATGTTACTA---TGTTTGTCTTCTTGCAGGTG 581
AG1_DK31_L TAATTTGTACATCGCAAATCAMGATTTTCATGTTACTA---TGTTTGTCTTCTTGCAGGTG 581
AG2_DK31_L TAATTTGTACATCGCAAATCAMGATTTTCATGTTACTA---TGTTTGTCTTCTTGCAGGTG 570
GE2_DK31_L TAATTTGTACATCGCAAATCAMGATTTTCATGTTACTA---TGTTTGTCTTCTTGCAGGTG 586
GE4_DK31_L TAATTTGTACATCGCAAATCAMGATTTTCATGTTACTA---TGTTTGTCTTCTTGCAGGTG 584
GE3_DK31_L TAATTTGTACATCGCAAATCAMGATTTTCATGTTACTA---TGTTTGTCTTCTTGCAGGTG 567
AG5_DK31_L TAATTTGTACATCGCAAATCAMGATTTTCATGTTACTA---TGTTTGTCTTCTTGCAGGTG 573
CE3_DK31_L TAATTTGTACATCGCAAATCACGATTTTCATGTTACTACTTTGTTTGTCTTCTTGCAGATG 555
CE6_DK31_L TAATTTGTACATCGCAAATCACGATTTTCATGTTACTACTTTGTTTGTCTTCTTGCAGATG 543
GE1_DK31_L TAATTTGTACATCGCAAATCAYGATTTTCATGTTACTACTTTGTTTGTCTTCTTGCAGATG 546
AG4_DK31_L TAATTTGTACATCGCAAATCAMGATTTTCATGTTACTA---TGTTTGTCTTCTTGCAGGTG 564
CE2_DK31_L TACTCACCATAACCGTGTTCAGGCTTGTGT-TCACCG---TACCCGTGTTCCGGTTGTTG 591
* *

CE1_DK31_L GTTGAAGTGTCC-TAATCCATAAAGCTCGCTGCTACAAATAAAAAGTGTGGAAAAT-GAGA 610
CE5_DK31_L GTTGAAGTGTCC-TAATCCATAAAGCTCGCTGCTACAAATAAAAAGTGTGGAAAAT-GAGA 617
CE4_DK31_L GTTGAAGTGTCC-TAATCCATRAAGCTCGCTGCTACAAATAAAAAGTGTGGAAAAT-GAGA 585
AG3_DK31_L GTTGAAGTGTCC-TAATCCATCAAGCTCGCTGCTACAAATAAAAAGTGTGGAAAAT-GAGA 604
GE5_DK31_L GTTGAAGTGTCC-TAATCCATCAAGCTCGCTGCTACAAATAAAAAGTGTGGAAAAT-GAGA 639
AG1_DK31_L GTTGAAGTGTCC-TAATCCATCAAGCTCGCTGCTACAAATAAAAAGTGTGGAAAAT-GAGA 639
AG2_DK31_L GTTGAAGTGTCC-TAATCCATCAAGCTCGCTGCTACAAATAAAAAGTGTGGAAAAT-GAGA 628
GE2_DK31_L GTTGAAGTGTCC-TAATCCATCAAGCTCGCTGCTACAAATAAAAAGTGTGGAAAAT-GAGA 644
GE4_DK31_L GTTGAAGTGTCC-TAATCCATCAAGCTCGCTGCTACAAATAAAAAGTGTGGAAAAT-GAGA 642
GE3_DK31_L GTTGAAGTGTCC-TAATCCATCAAGCTCGCTGCTACAAATAAAAAGTGTGGAAAAT-GAGA 625
AG5_DK31_L GTTGAAGTGTCC-TAATCCATCAAGCTCGCTGCTACAAATAAAAAGTGTGGAAAAT-GAGA 631
CE3_DK31_L GTTGAAGTGTCC-TAATCCATCAAGCTCGCTGCTACAAATAAAAAGTGTGGAAAAT-GAGA 613
CE6_DK31_L GTTGAAGTGTCC-TAATCCATCAAGCTCGCTGCTACAAATAAAAAGTGTGGAAAAT-GAGA 601
GE1_DK31_L GTTGAAGTGTCC-TAATCCATCAAGCTCGCTGCTACAAATAAAAAGTGTGGAAAAT-GAGA 604
AG4_DK31_L GTTGAAGTGTCC-TAATCCATCAAGCTCGCTGCTACAAATAAAAAGTGTGGAAAAT-GAGA 622
CE2_DK31_L CTCACCATAACCGTGTTCAGGCTTGTGT-TCACCG---GCTTG-TGCTACCGTACCCGTGTTCCGGTGTG 646
* *

CE1_DK31_L AAA----TAGGGGGAAAAAATTTTCTT-GTT-GT---TGTTGGCTACTCTTTGATTGTGT 661
CE5_DK31_L AAA----TAGGGGGAAAAAATTTTCTT-GTT-GT---TGTTGGCTACTCTTTGATTGTGT 668
CE4_DK31_L AAA----TAGGGGGAAAAAATTTTCTT-GTT-GT---TGTTGGCTACTCTTTGATTGTGT 636
AG3_DK31_L AAA----TAGGGGGAAAAAATTTTCTT-STT-GT---TGTTGGCTACTCTTTGATTGTGT 655
GE5_DK31_L AAA----TAGGGGGAAAAAATTTTCTT-STT-GT---TGTTGGCTACTCTTTGATTGTGT 690
AG1_DK31_L AAA----TAGGGGGAAAAAATTTTCTT-GTT-GT---TGTTGGCTACTCTTTGATTGTGT 690
AG2_DK31_L AAA----TAGGGGGAAAAAATTTTCTT-STT-GT---TGTTGGCTACTCTTTGATTGTGT 679

